

**EIN SELEKTIONSVERSUCH MIT MÄUSEN
AUF AKTIVITÄT ZYTOTOXISCHER T-LYMPHOZYTEN
GEGENÜBER P815 - MASTOCYTOMZELLEN**

SYBILLE SCHRADER

~~1987~~

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0106

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. H. G. Buschmann

EIN SELEKTIONSVERSUCH MIT MÄUSEN
AUF AKTIVITÄT ZYTOTOXISCHER T-LYMPHOZYTEN
GEGENÜBER P815-MASTOCYTOMZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Sybille Schrader
aus
Darmstadt

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. H. G. Buschmann

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil.
M. Stangassinger

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Meinen Eltern

1	Einleitung	1
2	1. Kapitel	2
3	2. Kapitel	3
4	3. Kapitel	4
5	4. Kapitel	5
6	5. Kapitel	6
7	6. Kapitel	7
8	7. Kapitel	8
9	8. Kapitel	9
10	9. Kapitel	10
11	10. Kapitel	11
12	11. Kapitel	12
13	12. Kapitel	13
14	13. Kapitel	14
15	14. Kapitel	15
16	15. Kapitel	16
17	16. Kapitel	17
18	17. Kapitel	18
19	18. Kapitel	19
20	19. Kapitel	20
21	20. Kapitel	21
22	21. Kapitel	22
23	22. Kapitel	23
24	23. Kapitel	24
25	24. Kapitel	25
26	25. Kapitel	26
27	26. Kapitel	27
28	27. Kapitel	28
29	28. Kapitel	29
30	29. Kapitel	30
31	30. Kapitel	31
32	31. Kapitel	32
33	32. Kapitel	33
34	33. Kapitel	34
35	34. Kapitel	35
36	35. Kapitel	36
37	36. Kapitel	37
38	37. Kapitel	38
39	38. Kapitel	39
40	39. Kapitel	40
41	40. Kapitel	41
42	41. Kapitel	42
43	42. Kapitel	43
44	43. Kapitel	44
45	44. Kapitel	45
46	45. Kapitel	46
47	46. Kapitel	47
48	47. Kapitel	48
49	48. Kapitel	49
50	49. Kapitel	50
51	50. Kapitel	51
52	51. Kapitel	52
53	52. Kapitel	53
54	53. Kapitel	54
55	54. Kapitel	55
56	55. Kapitel	56
57	56. Kapitel	57
58	57. Kapitel	58
59	58. Kapitel	59
60	59. Kapitel	60
61	60. Kapitel	61
62	61. Kapitel	62
63	62. Kapitel	63
64	63. Kapitel	64
65	64. Kapitel	65
66	65. Kapitel	66
67	66. Kapitel	67
68	67. Kapitel	68
69	68. Kapitel	69
70	69. Kapitel	70
71	70. Kapitel	71
72	71. Kapitel	72
73	72. Kapitel	73
74	73. Kapitel	74
75	74. Kapitel	75
76	75. Kapitel	76
77	76. Kapitel	77
78	77. Kapitel	78
79	78. Kapitel	79
80	79. Kapitel	80
81	80. Kapitel	81
82	81. Kapitel	82
83	82. Kapitel	83
84	83. Kapitel	84
85	84. Kapitel	85
86	85. Kapitel	86
87	86. Kapitel	87
88	87. Kapitel	88
89	88. Kapitel	89
90	89. Kapitel	90
91	90. Kapitel	91
92	91. Kapitel	92
93	92. Kapitel	93
94	93. Kapitel	94
95	94. Kapitel	95
96	95. Kapitel	96
97	96. Kapitel	97
98	97. Kapitel	98
99	98. Kapitel	99
100	99. Kapitel	100

INHALT

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	8
2. LITERATURÜBERSICHT	10
2.1 Zelluläre Grundlagen der Immunität	10
2.1.1 B-Lymphozyten	10
2.1.2 T-Lymphozyten	11
2.1.3 Makrophagen	14
2.1.4 Null-Zellen (Non-T-, Non-B-Zellen)	15
2.2 Zellvermittelte Immunität	18
2.2.1 MHC-Restriktion und MHC-Produkte	18
2.2.2 Aufbau des MHC-Komplexes	22
2.2.3 Antigenerkennung durch T-Zellen	24
2.2.4 Der T-Zell-Rezeptor	26
2.3 Genetische Kontrolle des Immunsystems	30
2.3.1 Bedeutung des MHC-Komplexes für das Immunsystem	31
2.3.2 Biologische Bedeutung des Polymorphismus	32
3. MATERIALIEN UND METHODEN	34
3.1 Verzeichnis der verwendeten Materialien	34
3.2 Ausgangsbasis	36
3.3 Versuchsaufbau und Durchführung	36
3.4 Tumorzellen	39
3.5 Immunisierung der Mäuse	40
3.6 Gewinnung der Effektorzellen	40
3.7 Markierung der Zielzellen mit $^{51}\text{Chrom}$	41
3.8 $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest	42
3.9 Cold Target Competition Assay	43
3.10 Zelluläre Immunadsorption	44

4.	ERGEBNISSE	47
4.1	Ergebnisse mit der Tumorzelllinie K562 in der F6 a	47
4.2	Ergebnisse mit der Tumorzelllinie EL4 in der F6 b	49
4.3	Ergebnisse mit der Tumorzelllinie P815 in der F7 a und F7 b	52
4.4	Ergebnisse mit der Tumorzelllinie EL4 in der F8 a	55
4.5	Ergebnisse des Cold Target Competition Assay	61
4.6	Ergebnisse der zellulären Immunadsorption	68
4.7	Vergleich der CTL-Antworten zwischen den Geschlechtern	70
5.	DISKUSSION	74
6.	ZUSAMMENFASSUNG	81
7.	SUMMARY	83
8.	LITERATURVERZEICHNIS	85
9.	DANKSAGUNG	99
10.	LEBENS LAUF	100
11.	ABKÜRZUNGEN	101

1. EINLEITUNG

Verschiedene Tiere einer Spezies können eine unterschiedlich stark ausgeprägte Immunantwort auf bestimmte Antigene zeigen, deren Ursache genetisch bedingt ist. Erste Experimente über die Bedeutung genetischer Faktoren für die Antikörperproduktion wurden 1943 von Scheibel durchgeführt, in denen Meerschweinchen auf hohe bzw. niedrige Antwort gegen Diphtherietoxin gezüchtet wurden (Scheibel, 1943). Ausgedehnte Studien der Immunantwort mit einfachstrukturierten Antigenen identifizierten autosomale dominante Gene - sogenannte Immune Response (Ir-)Gene (Benacerraf et al., 1963, McDevitt und Sela 1965, 1967), die die Antikörperantwort in antigenspezifischer Weise kontrollieren. Durch die im Laufe der Jahre erhaltenen Zusammenhänge zwischen Genetik und Immunantwort gewannen Selektionsversuche auf bestimmte immunologische Parameter zunehmend an Bedeutung.

In dem in dieser Arbeit vorgestellten Selektionsversuch sollte der genetische Hintergrund der zellvermittelten Immunität auf zelluläre Antigene bei der Maus weiter charakterisiert werden. Die Selektionsversuche begannen 1986 mit der Untersuchung der Immunantwort von Mäusen gegen P815-Mastocytomzellen (Schubert, 1986). Als Selektionsmerkmal wurde der CTL-Wert verwendet, der sich nach vorangegangener Immunisierung mit P815-Zellen im 10 Tage späteren ⁵¹Chrom-Freisetzungstest ergab. In dem anschließenden Selektionsschritt erfolgte die Paarung von Tieren mit hoher bzw. niedriger Immunantwort. Die vorliegende Arbeit umfaßt die Untersuchung der 6., 7. und 8. Generation und beschreibt neben den P815-

Zellen erstmals die Verwendung von K562- und EL4-Tumorzellen. Die Spezifität der erzeugten CTL-Antworten sollte mit Hilfe des Cold Target Competition Assay und der zellulären Immunadsorption überprüft werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Zelluläre Grundlagen der Immunität

Die Gesamtheit der Zellen des Immunsystems stammt von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab, aus denen sich zwei grundsätzliche Vorläuferzellgenerationen entwickeln (Wu et al., 1967, 1968):

1. Die Progenitorzellen der verschiedenen Blutzellen, aus denen sich im weiteren Verlauf der Differenzierung die Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten (neutrophil, eosinophil, basophil), Monozyten bzw. Makrophagen und vermutlich auch die Mastzellen entwickeln.
2. Die Progenitorzellen der lymphoiden Zellen, aus denen sich später in der fötalen Leber und im Knochenmark der Säugetiere bzw. in der Bursa Fabricii der Vögel die B-Lymphozyten, im Thymus die T-Lymphozyten entwickeln.

Der Ursprung der sog. Null-Zellen, die auf ihrer Oberfläche mit den herkömmlichen Methoden keine nachweisbaren Marker der T- oder B-Lymphozyten besitzen, ist bislang noch unklar.

2.1.1 B-Lymphozyten

Nach Ausdifferenzierung der lymphatischen Progenitorzellen in ihrem entsprechenden Milieu bilden die B-Lymphozyten die erste Hauptgruppe der immunkompetenten Zellen (Miller und Mitchell, 1968).



In ihre Zelloberfläche sind zwei Antikörper-Typen inseriert: IgD-Moleküle und eine monomere Form des IgM, die sich von der späteren, ins Serum sekretierten pentameren Form unterscheidet (Pernis et al., 1976). Diese beiden Immunglobulin-Rezeptoren sind auf der Oberfläche eines noch ruhenden B-Lymphozyten hinsichtlich ihrer Antigenbindungsstelle identisch, unterscheiden sich aber darin im Vergleich zu anderen B-Lymphozyten. Über ihre spezifischen Ig-Rezeptoren können sie freies Antigen binden, durch das sie in einem weiteren Differenzierungsschritt, unter Beteiligung von Makrophagen, T-Helferzellen und Lymphokinen, zur Reifung und Teilung angeregt werden (Melchers und Andersson, 1984). Die hieraus hervorgehende Plasmazelle sezerniert aktiv Antikörper mit der entsprechenden Antigen-spezifität, dabei kommt es vor allem zur Proliferation solcher B-Zell-Klone, die das Antigen am wirkungsvollsten erkennen (Burnet, 1959). Solche Plasmazellen können jetzt auch andere Immunglobulin-Klassen sezernieren (class-switch), wobei die Antigen-spezifität erhalten bleibt (Van der Loo et al., 1979). Gleichzeitig kommt es zur Bildung von sog. Memory-Zellen, die bei einem Zweitkontakt mit demselben Antigen zu einer schnelleren und verstärkten Immunantwort führen (Miller, 1973).

2.1.2 T-Lymphozyten

Die zweite Hauptgruppe der immunologisch kompetenten Zellen stellen die T-Zellen dar. Nach ihrer Differenzierung im Thymus besitzen sie typische Oberflächenmarker, anhand derer sowohl ihr Differenzierungsgrad als auch ihre funktionelle Zugehörigkeit bestimmt werden können. Im Unterschied zu

B-Zellen erkennen sie membranständiges und kein lösliches Antigen.

Thy 1: Dieses Oberflächenantigen befindet sich auf ca. 95 - 98 % aller Lymphozyten, und seine Expression ist das entscheidende Kriterium, um einen Lymphozyten als vom Thymus abstammende Zelle zu identifizieren (Reif und Allen, 1964).

Lyt-Antigene: Mit dieser Gruppe von Oberflächenantigenen kann man die T-Zellen in bestimmte Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen aufteilen, so handelt es sich bei Lyt 1⁺-Zellen um T-Helferzellen, bei Lyt 2⁺, 3⁺ um zytotoxische T-Zellen (Cantor und Boyse, 1975 a).

T-Helferzellen (TH): Sie sind die Schlüsselzellen für die antikörpervermittelte (humorale) und für die zellvermittelte Immunantwort und erkennen fremdes Antigen in Verbindung mit MHC-Produkten der Klasse 2. Durch Erkennung dieses Komplexes auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) werden sie einerseits selbst stimuliert, andererseits induzieren sie selbst die Proliferation von B-Zellen und deren Ausdifferenzierung zu Plasmazellen und ermöglichen somit die Antikörperproduktion (Claman et al., 1966). Gleichermaßen stimulieren sie Makrophagen durch Lymphokine und befähigen sie zur Abtötung von intrazellulärem Fremdantigen. Auch bei der Entstehung einer zytotoxischen T-Lymphozytenreaktion ist eine Kooperation zwischen beiden T-Zell-Populationen notwendig, nur wenn T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen interagieren, kommt es zu einer optimalen lytischen Reaktion (Cantor und Boyse, 1975 b).

T-Supressorzellen (TS): Sie sind zuständig für die spezifische Inhibition der Aktivität von Makrophagen, B-Zellen und T-Helferzellen, die durch fremde Antigene aktiviert wurden (Gershon, 1974). Das Immunsystem verfügt damit über die Möglichkeit einer negativen Rückkopplung, durch die die Immunreaktionen in erforderlichen Grenzen gehalten bzw. abgeschaltet werden können (Cantor und Gershon, 1979). Sogenannte Suppressorfaktoren werden für die Wirkung verantwortlich gemacht, die bei der Maus von der IJ-Region (siehe 2.2.2) determiniert werden sollen (Taniguchi et al., 1979). Während man eine Reihe von Faktoren mit suppressiver Wirkung isolieren konnte, ist die Existenz der IJ-Region im H-2-System weiterhin umstritten.

Zytotoxische T-Zellen (CTL): Ihre Funktion besteht in der Erkennung von MHC-Produkten der Klasse 1 in Assoziation mit fremdem Antigen auf der Zelloberfläche. Nach erfolgter Sensibilisierung durch das entsprechende Antigen in Verbindung mit einem MHC-Klasse-1-Molekül, Kontakt mit T-Helferzellen und Lymphokinaustausch sind sie in der Lage, virusinfizierte Körperzellen zu eliminieren (Zinkernagel und Doherty, 1974 a), fremde Gewebetransplantat-Antigene zu erkennen und allogene Transplantate abzustößen (Mitchison, 1954), ferner maligne entartete Zellen zu vernichten (Wallich et al., 1985). Ähnlich wie bei den B-Zellen kommt es bei einem Zweitkontakt mit demselben Antigen zu einer schnelleren und verstärkten CTL-Antwort.

DTH (Delayed Type Hypersensitivity)-reaktive T-Zellen: Diese T-Lymphozyten werden beim Erstkontakt mit bestimmten Mikroorganismen (z. B. Tuberkulose-Erreger) sensibilisiert. Ein zweiter Kontakt der DTH-reaktiven T-Zellen mit demselben Antigen

bewirkt, daß es zu einer Produktion und Freisetzung verschiedener Lymphokine kommt, die als Mediatoren chemotaktisch das lokale Verhalten von Makrophagen und neutrophilen Zellen beeinflussen (Vadas et al., 1976).

2.1.3 Makrophagen

Neben den B- und T-Zellen kommt noch einer weiteren Gruppe eine entscheidende immunologische Bedeutung zu, den Makrophagen. Als stationäre Zellen kommen sie in Geweben vor, z. B. als Kupfferzellen in der Leber, als dendritische Zellen in den Lymphknoten und in der Milz, als bewegliche Makrophagen bzw. Monozyten sind sie im Blut und besonders zahlreich in der Peritonealflüssigkeit zu finden. Diese Zellen haften leicht an Glas oder Plastikoberflächen und sind somit einfach von B- und T-Lymphozyten trennbar (Mosier et al., 1967). Man unterscheidet zwei funktionelle Gruppen: Makrophagen im herkömmlichen Sinn, die für die Phagozytose von Mikroorganismen, Tumorzellen und Fremdpartikeln zuständig sind, und deren Anheftung und Beseitigung über eine Bindung an IgG- und Komplement-Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche zusätzlich verstärkt werden können. Die zweite Gruppe beinhaltet Makrophagen als sog. antigenpräsentierende Zellen (APC), die Antigene in eine geeignete immunogene Form überführen (prozessieren) und so verarbeitet den antigensensibilisierten Lymphozyten (B und T) zusammen mit syngenen MHC-Klasse-2-Produkten darbieten (Feldmann et al., 1979).

Obwohl Makrophagen keine Antigenpezifität besitzen, spielen sie als APC eine entscheidende Rolle

bei der Entstehung der Immunantwort. Bei der humoralen Immunantwort sind die APC notwendig für die Antikörperproduktion (Gorczynski et al., 1971), bei den zellvermittelten Reaktionen bestehen noch komplexere Wechselwirkungen mit den T-Zellen, um eine Proliferation von antigenspezifischen T-Helferzellen zu induzieren (Erb und Feldmann, 1975).

2.1.4

Null-Zellen (Non-T-, Non-B-Zellen)

In der Lymphozytenpopulation gibt es Zellen, die weder die typischen Immunglobulin-Marker der B-Zellen (Ig^-) noch die Oberflächenmarker, z. B. Thy 1 der T-Zellen ($Thy\ 1^-$) besitzen. Es wird angenommen, daß die Nullzellen zum großen Teil aus natürlichen Killerzellen (NK) und Killer-Zellen (K) bestehen, ein kleiner Teil stellt wahrscheinlich Stammzellen und unreife T- oder B-Zellen dar.

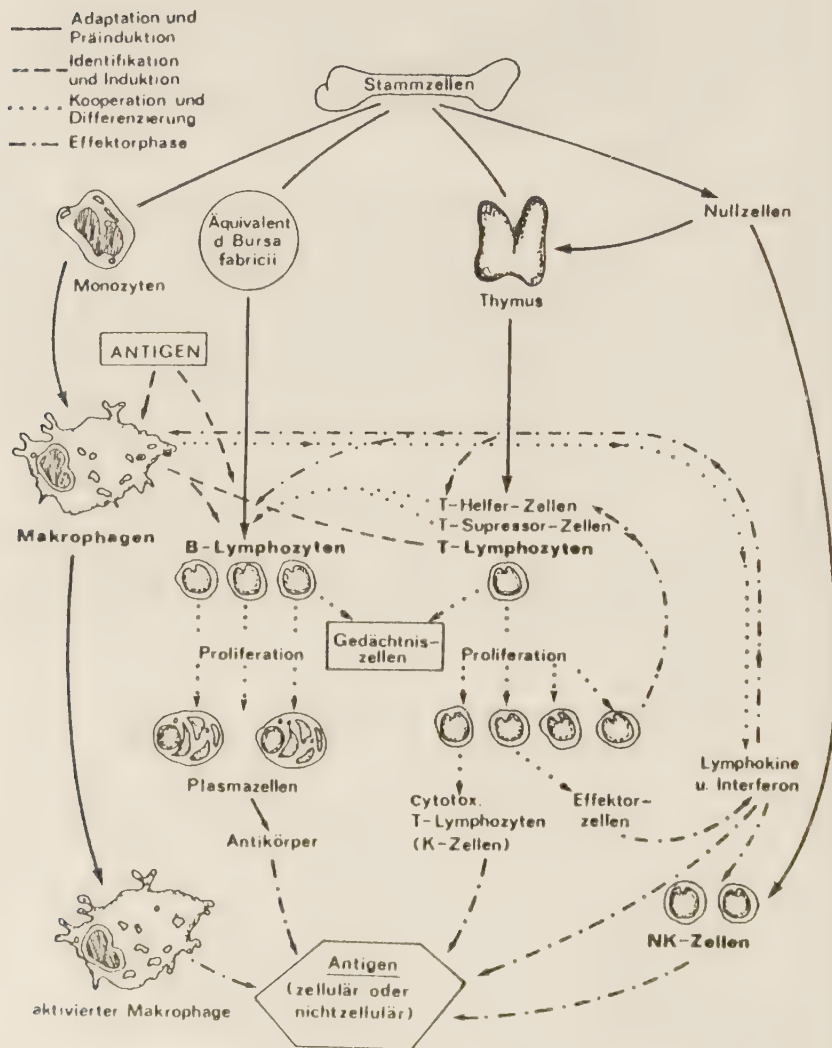
Natürliche Killerzellen (NK): Diese nicht adhären-ten, nicht phagozytierenden Zellen wurden zuerst von Herberman und Kiessling beschrieben (Herberman et al., 1975, Kiessling et al., 1975): Sie bestehen aus einer sehr heterologen Zellpopulation und sind in vitro in der Lage, ohne vorangegangene Sensibilisierung Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen spontan abzutöten. Ihre in-vivo-Bedeutung ist noch nicht vollständig geklärt, sie scheinen beteiligt zu sein bei der Tumorerüberwachung, der Lyse von virusinfizierten Zellen und der Resistenz bei Knochenmarktransplantationen (Herberman und Ortaldo, 1981). Im Gegensatz zu T-Zellen kommen sie auch in athymischen Mäusen vor, sind in ihrer Reaktion

nicht MHC-restringiert, besitzen kein immunologisches Gedächtnis und haben die Fähigkeit, eine große Auswahl an syngenem, allogenen und xenogenen Zielzellen zu lysieren. Wegen ihrer sofortigen Reaktionsfähigkeit wird ihnen eine wichtige Rolle in der ersten Abwehr zugesprochen, noch bevor B- und T-Zellen in Aktion treten (Roder und Haliotis, 1980).

Killerzellen (K): Ähnlich den NK-Zellen erfolgt auch hier die Elimination unspezifisch, im Unterschied zu jenen erfolgt diese Abtötung aber in einer antikörperabhängigen Reaktion (antibody dependent cell mediated cytotoxicity-ADCC), bei der die K-Zellen mit Hilfe ihrer Fc-Rezeptoren Zielzellen lysieren können, deren Zelloberfläche mit Antikörpern markiert ist.

Die auf den vorhergehenden Seiten beschriebenen Zellen des Immunsystems, ihre Herkunft und die wechselseitigen Beziehungen untereinander sind in Abbildung 1 grobschematisch dargestellt.

Abb. 1: Entwicklung und Kooperation der Zellen des Immunsystems, nach Rolle und Mayr (1984).



2.2 Zellvermittelte Immunität

Die klassische Definition versteht hierunter solche Immunreaktionen, bei denen im Gegensatz zur humoralen Immunantwort keine Antikörper beteiligt sind. So kann man diese auch nicht durch Serum, sondern nur mit den lymphatischen Zellen eines sensibilisierten Tieres übertragen (Mitchison, 1954). Anders als bei der Antikörperbildung, bei der die B-Zellen als Effektorzellen und die T-Zellen als Helferzellen fungieren, sind bei der zellvermittelten Immunantwort die T-Zellen sowohl Effektor- als auch Helferzellen.

Zu den mittlerweile bekanntesten Formen der zellvermittelten Immunantworten zählen die Überempfindlichkeit von verzögerten Typ (delayed type hypersensitivity = DTH), die Transplantatabstoßung, die Transplantat-versus-Empfänger-Reaktion (graft versus host reaction = GVH), die zytotoxische Lymphozytenreaktion (cytotoxic lymphocyte reaction = CTR) und die gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction = MLR) (Benacerraf und Unanue, 1979).

2.2.1 MHC-Restriktion und MHC-Produkte

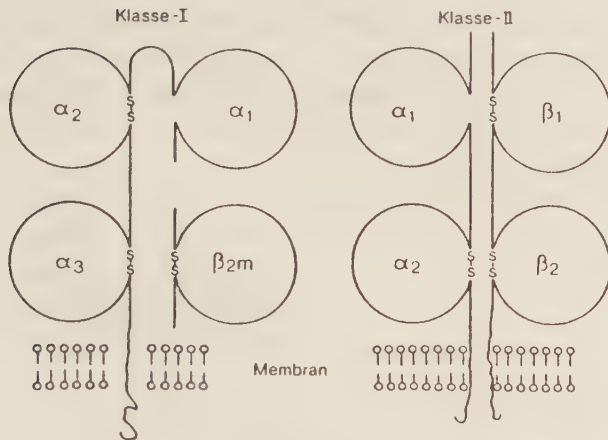
MHC-Restriktion: Die MHC-Einschränkung der zellvermittelten Immunität wurde bei der Entstehung von zytotoxischen T-Zellen gegen Viren (Zinkernagel und Doherty, 1974 a) bzw. gegen TNP-modifizierte syngene Zellen (Shearer et al., 1974) entdeckt. Beide Forschergruppen fanden heraus, daß Fremdanigene (Virus, TNP) nur im Zusammenhang mit syngenen MHC-Antigenen der Klasse I erkannt wurden. Kurz darauf

wurde dieses Phänomen auch für Nicht-Haupthistokompatibilitäts-Antigene (minor histocompatibility, non-H-2) (Bevan, 1975) und für männliche HY-Antigene (Gordon et al., 1975) nachgewiesen. MHC-Produkte, die die zytotoxischen T-Lymphozyten restringuieren, werden bei der Maus von der H-2K-, D- und L-Region des H-2-Komplexes kodiert (Bach et al., 1976). Regulatorische T-Helferzellen, die eine zelluläre oder humorale Immunantwort vermitteln, unterliegen dagegen den MHC-Produkten der Klasse 2, die in der I-Region des H-2-Komplexes kodiert werden (Katz et al., 1975, McDevitt et al., 1976).

MHC-Produkte (MHC-Moleküle, MHC-Antigene):

MHC-Klasse-1-Moleküle (H-2K-, D-, L-Antigene) sind auf der Zelloberfläche fast aller somatischen Zellen zu finden und stellen die klassischen Transplantationsantigene dar. Ihrer Struktur nach sind sie polymorphe Glykoproteine, die aus zwei Polypeptidketten bestehen (Cresswell et al., 1973). Eine schwere Kette verankert das Molekül in der Zelldoppelmembran, ihr extrazellulärer Teil besteht aus drei Domänen α_1 , α_2 und α_3 und ist nicht-kovalent verbunden mit einer leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m ; Grey et al., 1973).

Abb. 2a: Struktur der Klasse-1- und Klasse-2-Moleküle, in Abänderung nach Schwartz (1986)



Klasse 1: $\alpha_1 + \alpha_2$ - variable Domänen
 $\alpha_3 + \beta_{2m}$ - konstante Domänen
 Klasse 2: $\alpha_1 + \beta_1$ - variable Domänen
 $\alpha_2 + \beta_2$ - konstante Domänen
 S-S: Disulfidbrücken
 β_{2m} : β_2 -Mikroglobulin

Jüngste kristallographische Röntgenstrukturanalysen eines menschlichen Klasse-1-Antigens (HLA-A2) identifizierten einen tiefen Graben (ca. 25 Å lang, 10 Å breit, 11 Å tief) zwischen der α_1 - und α_2 -Domäne, der einen idealen Kandidaten für die Antigenbindungsstelle darstellt (Bjorkman et al., 1987 a). Hierfür sprechen weiterhin seine Dimension (passend für ein Antigenpeptid aus 10 - 20 AS) und die Tatsache, daß

sich die Mehrzahl der polymorphen AS der α -Helices am Boden und an den Seiten dieses Grabens befinden (Bjorkman et al., 1987 b).

Abb. 2b: Struktur eines menschlichen MHC-Klasse-1-Antigens (HLA-A2), nach Bjorkman et al. (1987 a), zeichnerische Darstellung (Seitenansicht) der vier Domänen (α_1 , $\alpha__2$, α_3 und β_{2m})



$\alpha_1 + \alpha_2$: membranferne, variable Domänen - formen eine waagrechte Plattform (β -Faltblattstruktur) mit zwei nach oben ragenden α -Helices, die zwischen sich die Antigenbindungsstelle bilden

$\alpha_3 + \beta_{2m}$: membrannähe, konstante Domänen

β_{2m} : β_2 -Mikroglobulin

C, N: Karboxyl- bzw. Stickstoffende der AS-Ketten

MHC-Klasse-2-Moleküle (H-2I-Antigene) findet man auf B-Zellen, Makrophagen bzw. Monozyten und einigen aktivierten T-Zellen (Hauptfeld et al., 1974). Es handelt sich ebenfalls um Glykoproteine, die aus zwei ungefähr gleichgroßen Polypeptidketten (α - + β -Kette) bestehen, die nicht-kovalent miteinander verknüpft sind. Jede Kette wiederum besteht, ähnlich wie beim MHC-Klasse-1-Molekül, aus je zwei extrazellulären Domänen (α_1 und α_2 bzw. β_1 und β_2) und reicht über ein transmembranöses und intrazytoplasmatisches Teil bis in die Zelle (Kaufmann et al., 1984).

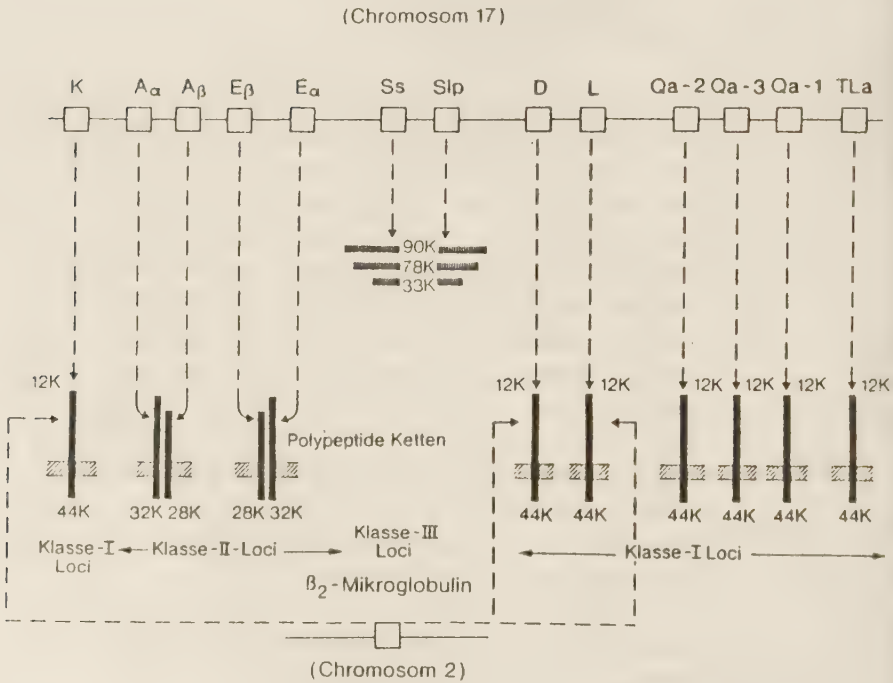
2.2.2 Aufbau des MHC-Komplexes

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC oder H-2) der Maus besteht aus einem Cluster von 20 - 40 Genen (individuelle Unterschiede), die bei der Maus auf dem Chromosom 17 lokalisiert sind (Klein, 1983). Aufgrund der unter 2.2.1 genannten serologischen und biochemischen Unterschiede der MHC-Moleküle werden die zugehörigen Gene in zwei Hauptgruppen unterteilt, man beschreibt sie als Klasse-1- und Klasse-2-Gene. Ausgehend von der klassischen Vorstellung des H-2-Komplexes, kodieren die Gene der K-, D- und L-Region für die Klasse-1-Antigene, die I-Region dagegen für die Klasse-2-Antigene. Eine dritte Klasse von Genen innerhalb des H-2, die sog. S-Region, bildet bestimmte Serumproteine und Komplementfaktoren (Klein, 1975).

Erweitert man das klassische Bild des H-2-Komplexes, so muß man auch die MHC-Klasse-1-ähnlichen, hämatopoetischen Differenzierungsantigene der Qa- und Tla-Region berücksichtigen. Diese Moleküle sind

strukturell eng mit den klassischen K-, D- und L-Antigenen verwandt, werden aber nur auf bestimmten Subpopulationen von Lymphozyten exprimiert (Klein, 1979). Ihre biologische Funktion könnte darin bestehen, den Polymorphismus von Klasse-I-Genen zu erhöhen, indem sie ein Donor-Reservoir an Gensegmenten darstellen, aus dem kurze Gensequenzen entnommen und durch Genkonversion in Klasse-I-Molekülen ausgetauscht werden können (Weiss, et al., 1983).

Abb. 3: Der H-2-Komplex und seine Produkte, in Abänderung nach Klein (1983)



Klasse-1-Loci: K, D, L; Qa-2, Qa-3, Qa-1, Tla

Klasse-2-Loci: A α , A β , E β , E α

Klasse-3-Loci: Ss, Slp

β_2 -Mikroglobulin: Bestandteil des Klasse-1-Moleküls, der vom Chromosom 2 kodiert wird

12-44K: Molekulargewicht in Kilo Dalton

2.2.3

Antigenerkennung durch T-Zellen

Ausgehend von dem Phänomen der MHC-Restriktion der T-Zellen, wurden schon kurz nach deren Entdeckung durch Zinkernagel und Doherty (1974 a) zwei grundsätzliche Modellvorstellungen diskutiert.

Die Einzelrezeptortheorie (single recognition) geht aus von einem einheitlichen Rezeptorkomplex, bei dem die Erkennungsvorgänge unterschiedlich interpretiert werden.

Die Altered-Self-Hypothese von Zinkernagel und Doherty (1974 b) fordert einen Rezeptor, der eine Neodeterminante erkennt, die durch Kombination von Fremdantigen und Selbst-MHC-Molekül neu entsteht ("Verändertes Selbst"). In einer weiteren Einzelrezeptortheorie wird eine "Assoziative Erkennung" postuliert (Pernis, 1985), bei der eine summative Erfassung von Antigen und autologer MHC-Determinante ohne Interaktion zwischen beiden Molekülen erfolgt.

Im Gegensatz hierzu steht die Doppelrezeptortheorie (dual recognition), die zwei physikalisch getrennte Erkennungsstrukturen fordert (Blanden und Ada,

1978). Hierbei erkennt der eine Rezeptor das Fremdantigen, der andere die Selbst-MHC-Struktur.

Die experimentellen Ergebnisse der letzten Jahre und besonders der jüngsten Vergangenheit favorisieren immer mehr die Einzelrezeptortheorie, die eine Neodeterminante von MHC-Molekül und Antigen annimmt (Marrack und Kappler, 1986). Dembic und Mitarbeiter fanden heraus, daß beim Transfer der T-Zell-Rezeptorgene von einer T-Zelle auf eine andere der neue T-Zell-Rezeptor der Empfängerzelle trotzdem beide Spezifitäten der Spenderzelle für MHC und Antigen besitzt (Dembic et al., 1986). Auch konnte gezeigt werden, daß von T-Helferzellen erkannte Antigen-Peptide sich mit signifikanter Affinität nur an entsprechende "Responder", aber nicht an "Non-Responder"-MHC-Klasse-2-Moleküle binden und dadurch die T-Helferzellen stimulieren (Babitt et al., 1985).

Mit der jüngsten Entdeckung, daß T-Zellen Antigen nicht als Ganzes, sondern in abgebauter und prozessierter Form, möglicherweise sogar nur als ganz bestimmte Peptidstücke zusammen mit dem entsprechenden MHC-Molekül erkennen (Townsend et al., 1985, 1986), mußten auch die Vorstellungen der Antigenerkennung revidiert werden. Weiterhin wird diskutiert, ob die Prozessierungswege für Antigen, das durch Klasse-1-restringierte T-Zellen erkannt wird, andere sind als die für Klasse-2-restringierte T-Zellen. So wäre eine innerhalb der Zelle stattfindende Antigenverarbeitung möglich, wobei intrazelluläre Vesikel Peptidprodukte von endogen synthetisierten Proteinen (Endoplasmatisches Retikulum → Golgi-Apparat, z. B. Virusproteine) zusammen mit MHC-Klasse-1-Molekülen an die Zelloberfläche trans-

portieren, während andere Vesikel den Endozytoseweg kreuzen und Peptide von durch Pinozytose aufgenommenen Proteinen (z. B. Fremdantigene) zusammen mit MHC-Klasse-2-Antigenen zur Zellmembran schleusen (Germain, 1986).

2.2.4 Der T-Zell-Rezeptor

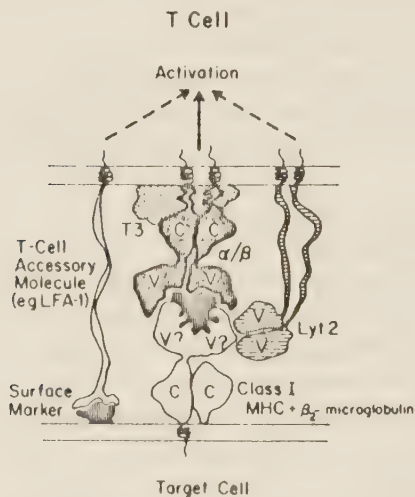
Die Oberflächenstruktur, durch die T-Zellen spezifische Antigene und MHC erkennen, wurde durch mehrere Forschergruppen identifiziert (Allison et al., 1982, Haskins et al., 1983, Meuer et al., 1983), denen es gelang, monoklonale Antikörper gegen klonierte T-Zellen herzustellen, die nur mit dem jeweiligen Zellklon spezifisch reagierten. Auf diese Weise konnte der T-Zell-Rezeptorkomplex isoliert und die molekularen Grundlagen aufgedeckt werden.

Jedes Rezeptormolekül besteht aus einer Alpha- und einer Beta-Kette, die den Rezeptor über einen kurzen hydrophoben, transmembranösen und einen intrazytoplasmatischen Teil auf der Zelloberfläche verankern. Jede Kette wiederum besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne, die beide als Gesamtheit für die MHC- und Antigenspezifität erforderlich sind (Yagüe et al., 1985). Ein weiterer Baustein, T3, besteht aus drei Polypeptiden, ist nicht-kovalent mit der α - und β -Kette assoziiert (Borst et al., 1983) und scheint verantwortlich zu sein für die Weiterleitung des antigenspezifischen Signals in das Innere der Zelle und den Beginn der zellulären Antwort auf das Antigen. Weiterhin findet man auf ausgereiften T-Zellen zwei als Lyt 2 und L3T4 bezeichnete Oberflächenmoleküle, deren

Funktion vermutlich in einer Bindung an nicht-polymorphe Regionen der MHC-Moleküle auf den Zielzellen besteht. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Bindungsaffinität zwischen T-Zellen und Zielzellen, wobei es im Fall eines CTL (Lyt 2) zu einer Bindung mit MHC-Klasse-1, bei einer TH (L3T4) zu einer Bindung mit MHC-Klasse-2 kommt (Marrak et al., 1983).

In Abbildung 4 ist ein T-Zell-Rezeptormodell dargestellt (Goverman et al., 1986)

Abb. 4: T-Zell-Rezeptormodell für eine zytotoxische T-Zelle, nach Goverman et al. (1986)



T-Zell-Rezeptor: α/β -Kette mit konstanten (C) und variablen (V) Domänen
 T3 - nicht-kovalent mit der α/β -Kette assoziiert

Lyt 2 - Oberflächenmolekül der CTL

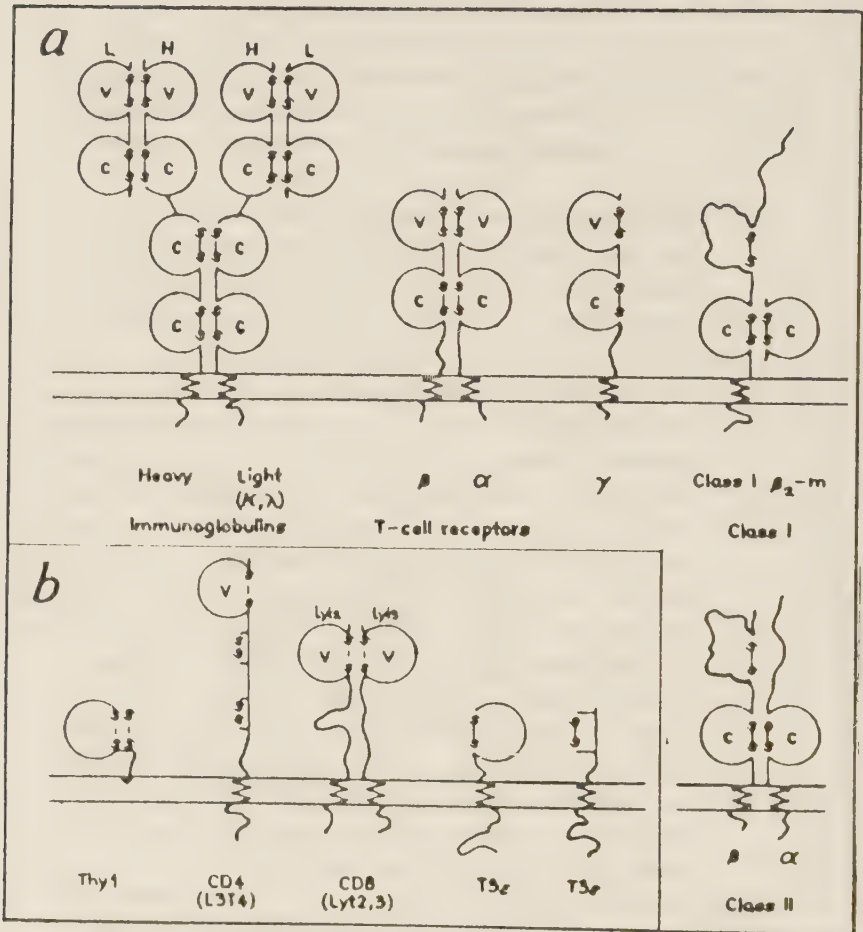
Antigen: schwarzer Komplex zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Klasse-1-Molekül

T Cell Accessory Molecule (e. g. LFA-1) = T-Zellen-Nebenmolekül, möglicherweise an der T-Zellen-Aktivierung beteiligt

Rezeptormodell für TH: L3T4-Oberflächenmolekül
(statt Lyt 2) und MHC-Klasse-2-Molekül
(statt Klasse-1)

Über einen molekularbiologischen Weg wurden 1984 zwei Genfamilien identifiziert, die während der somatischen Entwicklung der T-Zellen rekombiniert werden (Yanagi et al., 1984, Hedrick et al., 1984, Chien et al., 1984, Saito et al., 1984 b). Diese Genfamilien (alpha und beta) kodieren die entsprechenden Untereinheiten (α - und β -Kette) des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors, die erst später entdeckte dritte und vierte Genfamilie (gamma und delta) kodieren die γ -Kette (Saito et al., 1984 a) bzw. vermutete δ -Kette (Brenner et al., 1986) mit bisher noch unbekannter Funktion. Alle vier T-Zell-Rezeptorgenfamilien haben variable (V), verbindende (J) und konstante (C) Elemente, die den Immunglobulinen sowohl in Größe und Aminosäuresequenz ähnlich sind als auch auf gleichem Wege die Variabilität der T-Zell-Rezeptorketten durch Rekombination der einzelnen Gensegmente entstehen lassen (Kronenberg et al., 1986). Es existiert eine Reihe von Ähnlichkeiten zwischen Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgenen in bezug auf die genetische Organisation, die Struktur der Keimbahnen, die Signale für die Rekombination und die Art und Weise, wie ihre Vielfältigkeit erzeugt wird, so daß sie zu der sog. Immunglobulinsupergenfamilie zusammengefaßt wurden (Hood et al., 1985), die in Abbildung 5 dargestellt ist.

Abb. 5: Die Immunglobulinsupergenfamilie, nach Hun-
kapiller und Hood (1986)



- a) direkt an der Antigen-Interaktion beteiligte
Moleküle: Immunglobulin, T-Zell-Rezeptor, MHC-
Klasse-1-Molekül, MHC-Klasse-2-Molekül
- b) indirekt an der Antigen-Interaktion beteiligte
Moleküle: T-Zellen-Oberflächenmoleküle, z. B.
Thy 1, L3T4 (CD4-Mensch), Lyt 2,3 (CD8-Mensch),
T3 (ϵ, δ)

L	=	leichte Kette (K, λ)
H	=	schwere Kette
V	=	variable Domäne
C	=	konstante Domäne
S-S	=	Disulfidbrücken
β_2^m	=	β_2 -Mikroglobulin

2.3. Genetische Kontrolle des Immunsystems

Auf der Suche nach Blutgruppen-Antigenen bei Mäusen stieß Gorer 1937 auf eine Beziehung zwischen Blutgruppengenen und Empfänglichkeit für bestimmte Tumortransplantate. Für die entdeckten Blutgruppen- bzw. Allo(Fremd)-Gene wurde nachgewiesen, daß sie verantwortlich sind für die Abstoßung von fremden normalen und tumorösen Gewebetransplantaten. 1948 wurden diese Antigene durch Snell als histocompatibility antigens (Gewebeverträglichkeitsantigene) und die kodierenden Gene für diese Strukturen als histocompatibility gens (H-Gene) benannt. Mit der Entwicklung von kongenen (Unterschied in nur einem H-Genlocus) und rekombinanten Mäusen (Crossover innerhalb des H-2-Komplexes) durch Snell wurde entdeckt, daß Unterschiede im H-2-System eine sehr viel stärkere Abstoßung von Haut- oder Tumortransplantaten verursachten als nicht H-2-Unterschiede (Counce et al., 1956). Snell schloß dadurch auf zwei verschiedene H-Gentypen, die major (stark) und minor (schwach) H-2-Gene. Als sich herausstellte, daß der H-2-Locus aus mehr als einem Gen bestand, wurde er in major histocompatibility complex der Maus umbenannt.

Steigendes Interesse zog der MHC auf sich, als im Laufe der Zeit entdeckt wurde, daß in anderen Säugetieren sowie beim Menschen sehr ähnliche MHC-Komplexe vorkommen. Entscheidende Bedeutung wurde ihm schließlich zugesprochen, als sich bei der Empfänglichkeit unterschiedlicher Mäusestämme gegen Infektionen mit Gross-Virus (Lilly et al., 1964) und kurze Zeit darauf auch bei der Antikörperantwort auf bestimmte synthetische Polypeptide (McDevitt und Tyan, 1968) eine genetische Kontrolle durch den H-2-Komplex herausstellte.

2.3.1 Bedeutung des MHC-Komplexes für das Immunsystem

Abgesehen von der möglichen evolutionären Bedeutung kontrollieren die Gene des MHC eine große Anzahl immunologischer Funktionen. Angefangen bei der Ausbildung einer spezifischen Immunreaktion gegenüber thymusabhängigen Antigenen, weiterführend über zelluläre Wechselwirkungen zwischen Makrophagen und T-Zellen sowie T- und B-Zellen, bis hin zur Ausbildung von Suppressormechanismen durch T-Zellen steuert der MHC die Immunitätsbildung und damit auch die Empfänglichkeit eines Tieres gegenüber bestimmten Krankheiten. Schon seit einigen Jahren ist beim Menschen bekannt, daß mit dem Auftreten von bestimmten MHC-Antigenen ein Individuum gegen einige Krankheiten vermehrt empfänglich ist (Zinkernagel et al., 1979, Ryder et al., 1981). Einen Überblick über die Vielfalt der kontrollierten Eigenschaften vermittelt Tabelle 1.

Tabelle 1: Eigenschaften, die von Genen des H-2-Komplexes kontrolliert werden, nach Shreffler und David (1975)

Serologisch nachweisbare zelluläre Alloantigene
Transplantationsantigene
Zielantigene der zellvermittelten Lympholyse
Gemischte Lymphozytenreaktion
Immunantworten
Graft-versus-host-Reaktion
Serologisch nachweisbare I-Antigene (Ia-Antigene)
T-B-Zell-Interaktion
Hybridresistenz
Empfänglichkeit für Tumroviren
Serologisches Serumprotein
Testosteronspiegel
Komplementspiegel
Spiegel von Cyclo-AMP in der Leber

2.3.2 Biologische Bedeutung des Polymorphismus

Versucht man den MHC-Komplex rechnerisch einmal zu erfassen, so ergeben sich Millionen verschiedener Phänotypen, was bedeutet, daß hier ein äußerst polymorphes System vorliegt. Da dieses Phänomen nicht nur bei der Maus vorkommt, nimmt man an, daß sich dieser Polymorphismus im Laufe der Evolution als Selektionsvorteil herausgestellt hat. Sein enormes Ausmaß könnte sicherstellen, daß in einer "Auszucht-population" das Selbst-Nicht-Selbst-Erkennungssystem eines jeden Individuums unterschiedlich ist

(Klein und Figueroa, 1981). So vermuten viele Forscher, daß ein solches System einen Schutz vor der Antigenvielfalt der Mikroorganismen und Parasiten darstellt. Hätte eine Tierspezies nur eine limitierte Anzahl von Antigenen, gleichbedeutend mit blinden Flecken im T-Zell-Repertoire, die sie wahrnehmen könnten (Ischii et al., 1982), bestünde die Gefahr, einen fremden Mikroorganismus nicht zu erkennen, der strukturell ähnliche Determinanten wie der Wirt besitzt. So trägt offenbar die Diversität dieses multiallelen Komplexes dazu bei, daß verschiedene Individuen unterschiedliche Antigene erkennen, dadurch eine Heterozygotie innerhalb einer Population erhalten und damit die "Vitalität der Bastarde" sichergestellt ist.

Als ein "Lehrbeispiel" der Natur könnte man die in den letzten Jahren vom Aussterben bedrohten Geparden betrachten, die eine höhere Empfindlichkeit gegen Virus-Epidemien besitzen als andere Großkatzen. Der Verlust ihrer genetischen Variabilität, besonders aber des Polymorphismus der MHC-Klasse-1-Moleküle konnte als Ursache festgestellt werden (O'Brien et al., 1985). Diese Änderungen in ihrem Erbgut wurden durch einen Engpaß ihrer Populationsgröße und -dichte bedingt, der in den folgenden Jahren steigende Inzucht nach sich zog. Als Auslöser dieser Ereigniskette sind Dezimierung der Anzahl durch Überjagung und fortschreitende Eingrenzung des Lebensraumes zu betrachten.

"Der MHC besitzt also eine Schlüsselfunktion in Prozessen, die nicht nur über das Überleben eines Individuums, sondern über die Existenz der Art überhaupt entscheiden." (Klein et al., 1983)

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Verzeichnis der verwendeten Materialien

Antibiotikazusätze für die Kulturmedien -

Amphotericin B (2,5 mg/l, von Heyden GmbH, München)

Bykomycin (65.000 I.E./l, Byk Gulden, Konstanz)

Penicillin G (100.000 I.E./l, Hoechst AG, Frankfurt)

Streptothetat (100 mg/l, Grünenthal, Stolberg)

Tylosin (1 ml/l, Sigma, Deisenhofen)

^{51}Cr - Natriumchromat - $^{51}\text{Na}_2\text{CrO}_4$ (1 mCi/ml, CJS.1, Amersham, Firma Weissner, München)

EDTA - Ethylene diamine tetraacetic acid- Na_2 -salt, je 10 - 15 ml zum Ablösen der EL4 von der Zellkulturflasche, 1 mmolar (372,3 mg ad 1000 ml PBS, Serva, Heidelberg)

FKS - fötales Kälberserum, 5 - 10%iger Zusatz zu den Kulturmedien, hitzeinaktiviert (30 min, 56 °C, Biochrom, Berlin)

Formaldehydlösung (HCHO) - zur Fixierung des Monolayer bei der Immunadsorption (0,25 % gelöst in PBS, Merck, Darmstadt)

Kulturmedien -

Dulbecco - Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (Flow Laborat., Irvine, Scotland)

MEM - Eagle's Minimal Essential Medium (Biochrom, Berlin)

RPMI - RPMI 1640 (Blochrom, Berlin)

PBS - phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung

Narkose:

2 ml Ketanest (50 mg Ketamin-Base, Parke-Davis, München)

1 ml Rompun (20 mg Xylazin, Bayer, Leverkusen)
ad 3,25 ml NaCl

Dosis pro Maus: 0,15 - 0,25 ml ip.

Natriumbikarbonat - 8,8%ig, 12 - 14 ml/l Medium zur pH-Einstellung auf 7,2 - 7,4

Poly-L-Lysin - MGW > 300.000, 12 µg/ml in PBS
(Sigma Deisenhofen)

Pyruvat (Brenztraubensäure) - 1 mmolar (110,05 mg
ad 1000 ml PBS, Merck, Darmstadt) als 5%iger
Zusatz zum Dulbecco Medium

Triton - Detergens, 5%ig in Aqua steril (Sigma,
Deisenhofen)

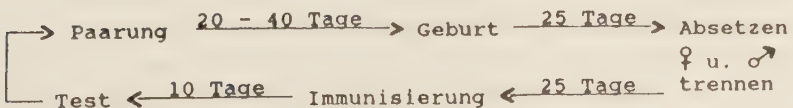
Trypanblau - Lebend-Tot-Färbung (0,18%ig in NaCl)

3.2 Ausgangsbasis

In diesem Selektionsversuch verwendete Mäuselinien wurden 1986 von Max Schubert aufgrund der Aktivität ihrer zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) während seiner Vorversuche aus 82 Tieren der laboreigenen Auszuchtspopulation POP (NMRI), 2 Tieren des CBA/J Inzuchtstammes und 7 Inzuchtmäusen Z/a ausgewählt. In den folgenden Generationen F1 und F2 wurden entsprechend der ermittelten zytotoxischen Lymphozytenreaktion (CTR) die Paarungen innerhalb der hohen und niedrigen Linie weitergeführt. Die Generationen F3, F4 und F5 wurden unter den gleichen Haltungs- und Versuchsbedingungen von Malou Zimmermann (1986) weitergeführt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Selektionsversuche gehen aus von Nachkommen der F5 und umfassen die Generationen F6, F7 und F8.

3.3 Versuchsaufbau und Durchführung

Die bisherigen Haltungsbedingungen im Tierlabor des Institutes für medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Universität München wurden beibehalten. Die Nachkommen jeder neuen Generation wurden im Alter von ca. 25 Tagen abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Mit Pikrinsäure wurden die Tiere individuell gekennzeichnet und durchliefen anschließend einen einheitlichen Immunisierungs- und Operationsplan.



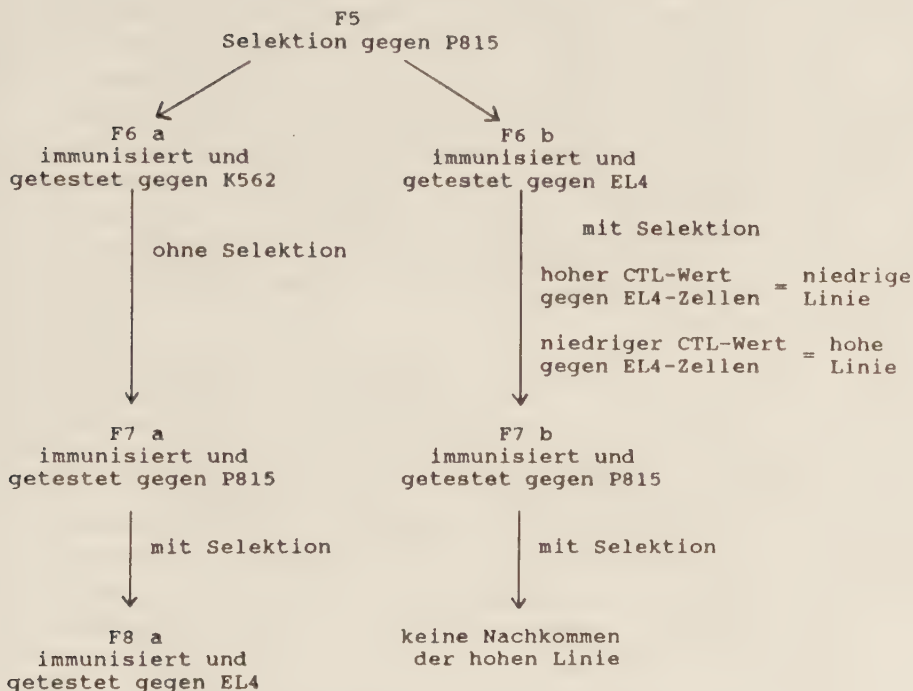
In der F6 wurde erstmals ein Zellwechsel vorgenommen, die eine Hälfte der Generation F6 a (68 Tiere) wurde mit K562 immunisiert und getestet, die andere Hälfte der Generation F6 b (50 Tiere) wurde mit EL4 immunisiert und getestet. Die Mäuse der Generation F6 a wurden innerhalb der hohen und niedrigen Linie ohne Selektion gepaart. Die Mäuse der gegen EL4-Zellen getesteten Generation F6 b wurden ebenfalls innerhalb der hohen und niedrigen Linie gepaart, in der hohen Linie wurden diejenigen Tiere selektiert, die unter einem durchschnittlichen CTL-Wert von 3,23 lagen, in der niedrigen Linie diejenigen Tiere, die über einem durchschnittlichen CTL-Wert von 5,80 waren.

In der F7 (125 Tiere) wurden die Mäuse wieder einheitlich mit P815 immunisiert und getestet sowie auch entsprechend ihrem individuellen, aus dem Test erhaltenen hohen bzw. niedrigen CTR-Wert selektiert.

In der 8. und letzten Generation (58 Tiere) wurde erneut ein Zellwechsel durchgeführt, es wurde wiederum mit EL4 immunisiert und getestet.

Ein schematischer Überblick über die erfolgten Immunisierungs- und Selektionsschritte vermittelt Tabelle 2.

Tab. 2: Immunisierungs- und Selektionsschema der Mäusegeneration F6, F7 und F8.



Um den Inzuchtindex so klein wie möglich zu halten, wurde auch in den Generationen F6, F7 und F8 darauf geachtet, daß möglichst keine verwandten Mäuse zur Paarung kamen; während des gesamten Selektionsversuches kam es zu keiner Bruder-Schwester-Paarung.

Zur weiteren Vereinheitlichung der CTR-Werte wurde die Versuchsdurchführung gestrafft, so daß alle Tiere in etwa dem gleichen Alter getestet wurden. Ab der F7 wurde darauf geachtet, daß in jedem Testansatz Tiere der hohen als auch der niedrigen Linie gemeinsam getestet wurden, um hiermit die Versuchsbedingungen möglichst einheitlich zu gestalten.

3.4

Tumorzellen

Bei den bisher verwendeten Tumorzellen handelt es sich um P815-Mastozytomzellen von DBAf/2-Mäusen, mittlerweile eine klassische Zielzelle für CTL-Tests. Sie wurden 1957 von Dunn und Potter durch Bepinseln der Haut mit 0,2%igem Methylcholanthren in Äther in einer männlichen DBAf/2-Maus induziert und in der Folge durch Transplantation auf andere Mäuse alle 4 - 5 Wochen weitervermehrt. Beim 3. Transfer gelang es ihnen, neben der soliden Tumormasse auch eine Ascitesform der Tumorzellen zu erzeugen.

Neu hinzu kam die Tumorzelllinie K562, die 1970 im Labor von Lozzio und Lozzio aus einem Pleuraerguß eines Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie in akuter blastischer Krise gewonnen und als hochgradig undifferenzierte Zelle der Granulozytenreihe charakterisiert wurde. K562 hat sich mittlerweile als hervorragendes Target für NK-Tests bewährt. In xenogenen Empfängern (z. B. Ziegen) kommt es zur Bildung von Antikörpern, die mit gutem Erfolg für eine passive Immuntherapie menschlicher Leukämien herangezogen wurden (Lozzio und Lozzio, 1979).

Als Alternative zu der Immunisierung mit K562 wurden EL4-Zellen gewählt, eine T-Zell-Leukämielinie, die erstmalig 1945 von Gorer durch Behandlung einer C57Bl/6N-Maus mit 9,10-dimethyl-1,2-benzanthrazen erzeugt und durch sc.- oder ip.-Inokulation von Zellsuspensionen in andere Mäuse fortgepflanzt wurde (Gorer, 1950).

Alle Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank mit 5 % CO₂ in Kultur gehalten und durch Mediumwechsel vermehrt. Bei den verwendeten Kulturmedien handelte es sich bei P815-Zellen um MEM, bei K562-Zellen um RPMI und bei EL4-Zellen um Dulbecco. Den Medien wurden die unter Punkt 3.1 angegebenen Antibiotika zugesetzt, der pH-Wert durch Zugabe von Natriumbicarbonat auf 7,2 bis 7,4 eingestellt und kurz vor der Verdünnung der Zellen mit dem neuen Medium 10 % FKS hinzugefügt. Zu dem Medium von EL4 wurde zusätzlich noch 5 % Pyruvat dazugegeben.

3.5 Immunisierung der Mäuse

In den Dosis-Response-Versuchen mit K562-Zellen und später mit EL4-Zellen wurde den Mäusen eine unterschiedliche Anzahl von lebenden Tumorzellen injiziert. Es wurde jeweils zwei Tieren die Dosis von 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 und 2×10^7 K562- bzw. EL4-Zellen in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. injiziert. Während der übrigen Selektionsversuche wurde eine konstante Zahl von 2×10^7 lebenden Tumorzellen in 0,2 ml Volumen ip. verwendet.

3.6 Gewinnung der Effektorzellen

Am 10. Tag nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit einer Ketamin-Rompun-Mischung (siehe 3.1.) in Narkose gelegt und ihre Milz unter antiseptischen Bedingungen entnommen. Die Milz wurde über einem Drahtnetz (0,5 mm Maschenweite) in physiologischer Kochsalzlösung zerrieben, über eine sterile Gaze filtriert und dreimal zentrifugiert (800 g/5 min).

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 15 - 20 ml MEM aufgenommen, sorgfältig resuspendiert und für 15 Minuten zur Sedimentation der schwereren Milzbestandteile stehen gelassen. Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert (800 g/5 min) und anschließend in jeweils 3 ml MEM + 10 % FKS aufgenommen. Aus jeder Milzzellensuspension wurden nun 40 μ l entnommen und in einem Lymphozytenzählgerät (Blood Cell Counter HC 222, Firma Clinikon, Mannheim) ausgezählt. Ausgehend von dem ermittelten Lymphozytenwert, wurden jeweils die entsprechenden notwendigen Mengen für die Verdünnungsstufen im Verhältnis Zielzellen : Effektorzellen von 1 : 200 (10×10^6 Zellen pro ml), 1 : 150 ($7,5 \times 10^6$ Zellen pro ml) und 1 : 100 (5×10^6 Zellen pro ml) errechnet und hergestellt.

3.7

Markierung der Zielzellen mit 51 Chrom

Der zur Messung der CTR verwendete Test basiert auf einer Markierung der Zielzellen mit einem radioaktiven Isotop (z. B. 51 Chrom), das bei ihrer Zerstörung durch die dazugegebenen Effektorzellen wieder freigesetzt wird (Brunner et al., 1968), dabei korreliert die Menge des freigesetzten Isotops mit dem Ausmaß der erfolgten Lyse.

Die jeweils benötigten Zielzellen (P815, K562, EL4) wurden in erforderlicher Menge aus den Zellkulturflaschen entnommen und zentrifugiert (450 g/5 min). Der Überstand wurde sehr genau abpipettiert und das Pellet in 1 ml MEM + 5 % FKS aufgenommen, gut resuspendiert und 100 μ l zum Zählen (Vitalfärbung mit Trypanblau, Thoma-Zählkammer) entnommen. Die aus-

gerechnete Menge von 2×10^6 Zellen in nicht mehr als 200 μ l MEM + 5 % FKS wurde mit der nach einer Kalibrierungstabelle zu bestimmenden Menge von radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$ (1 mCi pro ml) in ein gemeinsames Röhrchen überführt. Mit nur aufgelegtem, lockerem Deckel und unter gelegentlichem Aufschütteln wurden die Zellen für 50 - 55 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Mit jeweils 4 ml MEM + 10 % FKS wurden die markierten Zellen danach dreimal gewaschen und nach dem letzten Mal in ein Volumen von 40 ml aufgenommen, wodurch man eine Zellzahl von 5×10^4 Zielzellen pro ml erhielt.

3.8

Der $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest

Zur Bestimmung des jeweiligen CTR-Wertes wurden in einer Mikrotiterplatte (U-Form, Firma Greiner) die lt. obiger Beschreibung hergestellten Effektor- und Zielzellen zusammengebracht. Für jede einzelne Maus wurden jeweils 100 μ l der entsprechenden Zielzellensuspension (im Verhältnis Zielzellen : Effektorzellen von 1 : 200, 1 : 150, 1 : 100) mit 100 μ l der Effektorzellen zusammenpipettiert. Zur Bestimmung des Spontan Release (SR) wurden in 6 Mikrolöchern jeweils 100 μ l MEM + 100 μ l Zielzellen zusammenpipettiert, zur Ermittlung des Maximal Release (MR) je 6 Löcher mit 100 μ l Triton und 100 μ l Zielzellen gefüllt. Nach 4 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 wurde aus jedem Loch ein Überstand von 100 μ l vorsichtig entnommen, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und im Gammacounter (Searle Analytics, USA) gezählt. Der CTL-Wert der getesteten Mäuse wurde nach folgender Formel aus dem Prozentsatz der spezifischen Lyse der Targetzellen (Mittelwert der Triplikate) berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse der Targetzellen} = \frac{\text{experimentelle } ^{51}\text{Chrom-Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}}{\text{maximale } ^{51}\text{Chrom-Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}} \times 100$$

3.9

Cold Target Competition Assay (Kompetitionstest zwischen markierten und unmarkierten Zielzellen)

Dieser Test wurde nach Angaben von Landazuri und Herbermann (1972) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen Kompetitionstest, bei dem markierte mit unmarkierten Zielzellen um die Effektorzellen konkurrieren. Um die Spezifität der Effektorzellen zu untersuchen, verdünnt man in einem ersten Ansatz markierte Zielzellen (z. B. P815) mit denselben unmarkierten Zellen (z. B. P815), in einem zweiten Ansatz markierte Zielzellen (z. B. P815) mit verschiedenartigen unmarkierten Zellen (z. B. EL4).

Für die Immunisierung wurden 10 weibliche NMRI-Mäuse im Alter von 8 Wochen verwendet. Jeweils 5 Tiere wurden mit EL4-Zellen, die anderen 5 mit P815-Zellen immunisiert. Ihre Effektorzellen wurden, wie unter Punkt 3.6 beschrieben, gewonnen und in zwei Milzzellen-Pools von einerseits P815-immunisierten und andererseits EL4-immunisierten Mäusen zusammengefaßt. Die Tests wurden wiederum als Triplicate in U-förmigen Mikrotiterplatten (Firma Greiner) durchgeführt. $^{51}\text{Chrom}$ -markierte Zielzellen wurden, wie unter Punkt 3.7 beschrieben, hergestellt und hiervon jeweils 100 μl (5×10^3) in jedes Loch gegeben. In den Kontrolluntersuchungen wurden ausschließlich markierte Zielzellen ohne einen Verdünnungsschritt mit unmarkierten Zielzellen gegen die jeweiligen Effektorzellen getestet. Für den Kompetitionstest wurden unmarkierte (kalte)

Zielzellen in 4 unterschiedlichen Konzentrationen (4×10^5 pro ml, 2×10^5 pro ml, 1×10^5 pro ml, 5×10^4 pro ml) hergestellt und jeweils in einem Volumen von 50 μ l den verschiedenen Testlöchern dazugefügt. Hierdurch entstand ein Verhältnis von unmarkierten zu markierten Zielzellen von 4 : 1, 2 : 1, 1 : 1 und 0,5 : 1. Schließlich wurden noch die jeweiligen Effektorzellen der entsprechenden Mäuse (entweder immunisiert mit EL4- oder P815-Zellen) hinzupipettiert. Diese Zugabe erfolgte ebenfalls in einem Volumen von 50 μ l und in einem Verhältnis der Effektorzellen : Zielzellen von 200 : 1, 100 : 1 und 50 : 1 zu den markierten Zielzellen. Auf Platte A und B wurden Effektorzellen von mit P815 immunisierten Mäusen gegen markierte P815-Zellen getestet, die auf Platte A mit unmarkierten P815-Zellen, auf Platte B mit unmarkierten EL4-Zellen verdünnt wurden. Entsprechend wurden auf Platte C und D markierte EL4-Zielzellen gegen Effektorzellen von mit EL4 immunisierten Mäusen getestet. Die markierten EL4-Zielzellen wurden auf Platte C mit unmarkierten EL4-Zellen und auf Platte D mit unmarkierten P815-Zellen verdünnt. Spontan Release, Maximal Release und spezifische Lyse der Targetzellen wurden, wie unter Punkt 3.8 beschrieben, ermittelt und berechnet.

3.10 Zelluläre Immunadsorption

Die Methodik für diesen Test wurde aus Stulting und Berke (1973) entnommen. Auf einem Monolayer (einschichtige Zelllage) aus Zielzellen werden die jeweiligen Effektorzellen inkubiert und vor bzw. nach diesem Schritt wird die CTR gemessen. Bei der spezifischen Reaktion zwischen Effektor- und Zielzel-

len werden erstere adsorbiert und zurückgehalten, eine CTR nach der Inkubation ist damit nicht mehr vorhanden. Kommt es zu keiner spezifischen Reaktion zwischen Effektor- und Zielzellen, so läßt sich eine unveränderte CTR auch nach der Adsorption nachweisen.

Für diese Versuche wurden 8 weibliche, 8 Wochen alte NMRI-Mäuse je zur Hälfte mit P815 und EL4, wie unter Punkt 3.5 beschrieben, immunisiert, am 10. Tag nach der Immunisierung splenektomiert und ihre Effektorzellen laut Punkt 3.6 gewonnen.

Für die Immunadsorption wurden sterile Gewebekulturschalen (35 x 10 mm, Firma Falcon) mit Poly-L-Lysin bedeckt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Schalen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen und darauf $1,5 \times 10^7$ EL4-Zellen in 1 ml Volumen gegeben. Die Petrischalen wurden bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend bei 37°C im Brutschrank mit 5 % CO_2 für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig entfernt und 1 ml einer eiskalten 0,25%igen Formaldehydlösung zu jeder Schale gegeben. Erneut wurden die Schalen für 2 Stunden bei 5°C inkubiert, dann 3 x mit PBS vorsichtig gewaschen, eine Stunde bei Zimmertemperatur belassen, ein letztes Mal gewaschen und anschließend verwendet. Von den zwischenzeitlich auf 5×10^6 eingestellten Effektorzellen wurde jeweils 1 ml auf jede Schale aufgetragen. Je 4 Petrischalen wurden so mit Effektorzellen von Mäusen, die mit EL4-Zellen immunisiert worden waren, und je 4 Schalen von Mäusen, die mit P815-Zellen immunisiert worden waren, hergestellt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 100 g wurden die Schalen bei 37°C und 5 % CO_2 im

Brutschrank für 5 Stunden inkubiert. Nach erfolgter Adsorption wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die darin enthaltenen, nicht adhärenen Zellen zentrifugiert (100 g/ 5 min), ausgezählt und auf die Effektor-Zielzellen-Verhältnisse (200 : 1, 100 : 1, 50 : 1) eingestellt. Die somit nicht durch die Adsorption zurückgehaltenen Effektorzellen wurden in dem unter Punkt 3.8 beschriebenen Test einerseits gegen markierte P815-Zielzellen, andererseits gegen markierte EL4-Zielzellen getestet. Zur Kontrolle wurden Effektorzellen ohne einen vorhergehenden Adsorptionsschritt getestet, der Spontan Release, Maximal Release und die spezifische Lyse wurden wie unter Punkt 3.8 ermittelt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse mit der Tumorzelllinie K562 in der F6 a

Die Ergebnisse des Dosis-Response-Versuches mit 8 Tieren der F6 a ergaben sehr niedrige CTL-Antworten, die nur eine Aussage über die Minimaldosis, die bei mindestens 1×10^7 K562-Zellen lag, erlaubten.

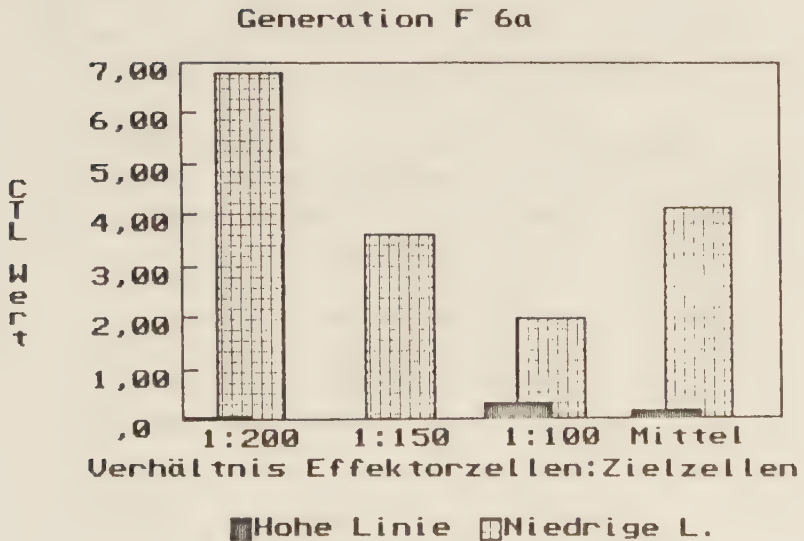
Tab. 3 Dosis-Response-Beziehung bei Immunisierung mit K562, angegeben ist der Prozentsatz spezifischer $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzung

Immunisierungs- dosis	CTL-Wert bei verschiedenen Effektor : Zielzellen-Verhältnissen		
	200 : 1	150 : 1	100 : 1
$1,5 \times 10^7$	2,57	1,75	0
"	2,73	1,67	0
1×10^7	0,45	0,18	0
"	0	0	0
1×10^6	0	0	0
"	0	0	0

Die folgenden Testserien ergaben CTL-Antworten mit sehr großer Schwankungsbreite, die in keiner Relation zur hohen oder niedrigen Linie standen. Nach Einbau eines zusätzlichen Zentrifugationsschrittes vor der Abnahme der $100 \mu\text{l}$ Überstand stellte sich heraus, daß die schwankenden Werte bedingt waren durch im Überstand befindliche K562-Zellen, die beim Abpipettieren miterfaßt wurden. Ab Einführung

dieses Zentrifugationsschrittes lagen alle Mäuse in dem CTL-Wert unter 1,4. Somit wurde festgestellt, daß durch eine Immunisierung mit der Zelllinie K562 keine zytotoxische T-Zellen-Antwort stimuliert werden konnte. Einen Überblick über die CTL-Werte in den jeweiligen Verhältnissen der Effektor : Zielzellen vermittelt Abbildung 5.

Abb. 6: CTL-Werte der Generation F6 a (gegen K562)



4.2

Ergebnisse mit der Tumorzelllinie EL4 in der F6 b

Der Dosis-Response-Versuch mit je 4 Tieren der hohen und niedrigen Linie ergab bei gleicher Immunisierungsdosis eine höhere CTL-Antwort der low responder gegen EL4 (siehe Tabelle 4b) verglichen mit der Antwort der high responder (siehe Tabelle 4a). Auch lag die Reaktionsschwelle der niedrigen Linie schon bei 1×10^5 EL4-Zellen, und bei der nächsthöheren Dosis wurde bereits eine deutliche CTL-Antwort gemessen, die Reaktionsschwelle der hohen Linie dagegen begann erst bei 1×10^7 EL4-Zellen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß sich die CTL-Werte der hohen und niedrigen Linie im Test gegen EL4-Zellen "umgekehrt" verhalten wie bei Immunisierung und Test gegen P815-Zellen.

Tab. 4a: Dosis-Response-Beziehung bei Immunisierung mit EL4, angegeben ist der Prozentsatz spezifischer $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzung, untersucht an Mäusen der hohen Linie

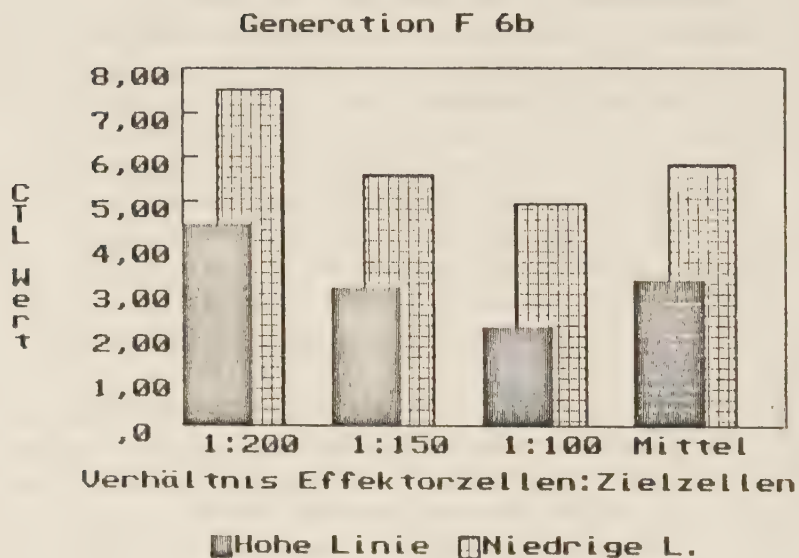
Immunisierungs- dosis	CTL-Wert bei verschiedenen Effektor : Zielzellen-Verhältnissen		
	200 : 1	150 : 1	100 : 1
2×10^7	15,40	9,54	5,40
1×10^7	7,23	3,39	1,82
1×10^6	1,28	0	1,34
1×10^5	1,96	0,95	0,63

Tab. 4b: Dosis-Response-Beziehung bei Immunisierung mit EL4, angegeben ist der Prozentsatz spezifischer ⁵¹Chrom-Freisetzung, untersucht an Mäusen der niedrigen Linie

Immunisierungs- dosis	CTL-Wert bei verschiedenen Effektor : Zielzellen-Verhältnissen		
	200 : 1	150 : 1	100 : 1
2×10^7	18,14	13,73	10,62
1×10^7	16,68	11,46	10,40
1×10^6	13,17	4,59	5,78
1×10^5	7,77	5,46	3,81

Die Generation F6 b bestand aus 24 Tieren der hohen Linie, von denen die 12 Männchen mit einer durchschnittlichen CTR von $3,59 \pm 3,59$, die 12 Weibchen mit einer durchschnittlichen CTR von $2,89 \pm 2,27$ abschnitten. Von den 26 Tieren der niedrigen Linie ergab sich bei den 14 Männchen eine CTR von $6,25 \pm 4,47$, bei den 12 Weibchen eine CTR von $5,37 \pm 4,84$. Einen Überblick über die CTR-Werte der F6 b befindet sich in Abbildung 7.

Abb. 7: CTL-Werte der Generation F6 b (gegen EL4)

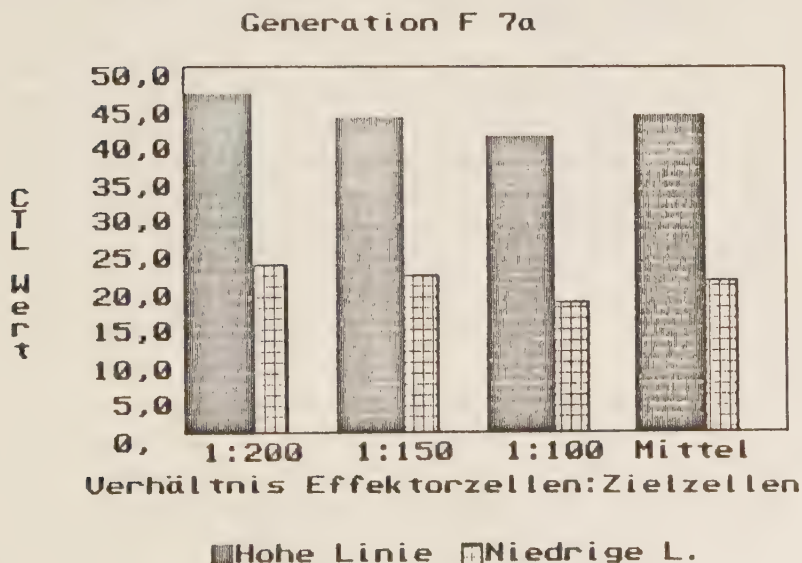


Die Berechnung des Signifikanztests für den Unterschied zwischen hoher und niedriger Linie ergab bei den Männchen und Weibchen keinen signifikanten Unterschied, beide Geschlechter zusammengefaßt ergaben einen hochsignifikanten Unterschied (siehe Tabelle 5, Seite 56).

4.3 Ergebnisse mit der Tumorzelllinie P815 in der F7 a und F7 b

In der F6 a konnte mit der Zelllinie K562 keine CTL-Antwort induziert werden, deswegen wurden ihre Nachkommen innerhalb der hohen und niedrigen Linie ohne Selektion gepaart. Die hieraus entstandene F7 a umfaßte eine Gesamtzahl von 66 Tieren, von denen 17 Tiere der hohen, 49 Tiere der niedrigen Linie angehörten. Bei den 10 Männchen der hohen Linie wurde ein CTL-Wert von $47,81 \pm 19,04$, bei den 7 Weibchen ein CTL-Wert von $36,64 \pm 11,78$ erhalten. In der niedrigen Linie erreichten die 23 Männchen CTL-Werte von $22,17 \pm 12,08$, die 26 Weibchen CTL-Werte von $19,34 \pm 10,94$. Graphische Darstellung siehe Abbildung 8.

Abb. 8: CTL-Werte der Generation F7 a (gegen P815)

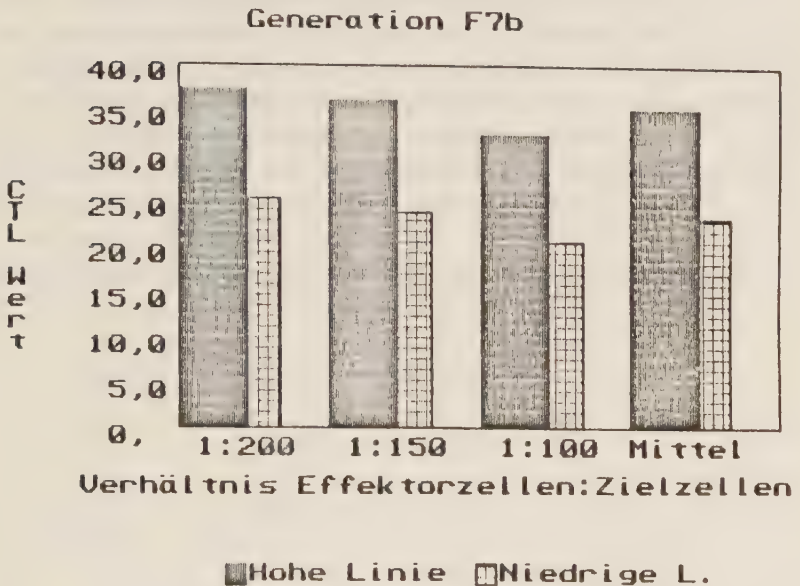


Der Unterschied zwischen der hohen und niedrigen Linie wird in der F7 a besonders deutlich. Die Ursache hierfür könnte im Fehlen maternaler Effekte liegen, da die vorhergehende Generation F6 a mit dem nicht kreuzreagierenden K562-Zellstamm immunisiert worden war.

In der Signifikanzberechnung des Unterschiedes zwischen den Männchen, den Weibchen sowie der Gesamtpopulation der hohen und niedrigen Linie in der F7 a konnte für alle drei Parameter ein hochsignifikanter Unterschied berechnet werden (siehe Tabelle 5, Seite 56).

Die Tiere der F6 b wurden durch einen Selektionsschritt weitergezüchtet, bei dem innerhalb der hohen Linie Tiere mit einem CTL-Wert unter 3,23 sowie in der niedrigen Linie Tiere mit einem CTL-Wert über 5,80 gepaart wurden. Die daraus hervorgehende Generation F7 b wurde erneut gegen P815-Zellen immunisiert und getestet. Die 14 Tiere der hohen Linie erreichten bei den 9 Männchen eine CTR von $43,32 \pm 20,02$, bei den 5 Weibchen eine CTR von $20,92 \pm 20,40$. Unter den 45 Tieren der niedrigen Linie ergab sich bei den 29 Männchen eine CTR von $25,05 \pm 13,91$, bei den 16 Weibchen von $20,09 \pm 14,34$. Graphische Darstellung siehe Abbildung 9.

Abb. 9: CTL-Werte der Generation F7 b (gegen P815)



Die auch hier berechnete Signifikanz des Unterschiedes zwischen hoher und niedriger Linie in der F7 b war bei den Männchen hochsignifikant, bei den Weibchen nicht signifikant und für die Gesamtpopulation lag der Unterschied am Rande der Signifikanz (siehe Tabelle 5, Seite 56).

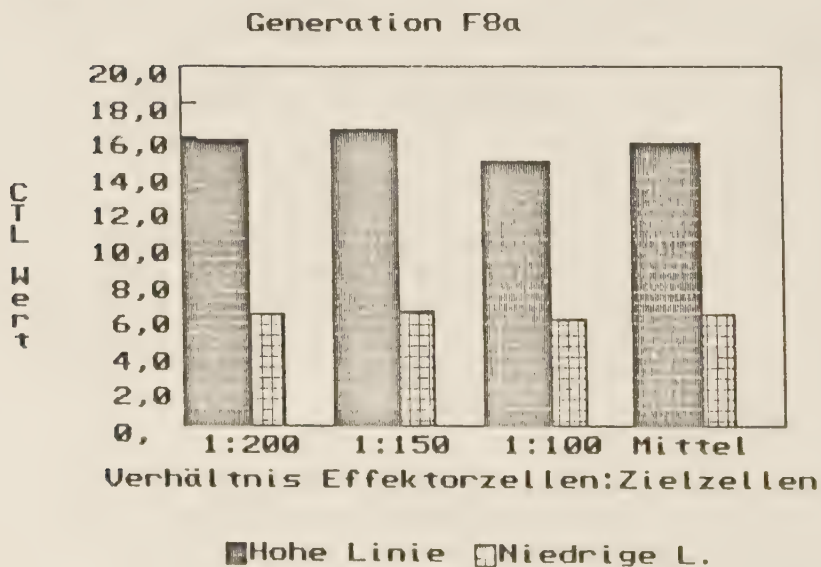
Das auffälligste Ergebnis der Generation F7 b war der weiterhin bestehenbleibende Unterschied zwischen hoher und niedriger Linie, obwohl die vorhergehende Generation F6 b "umgekehrt" selektiert worden war (geringer CTL-Wert gegen EL4 = hohe Linie, hoher CTL-Wert gegen EL4 = niedrige Linie).

4.4

Ergebnisse mit der Tumorzelllinie EL4 in der F8 a

Die Eltern dieser Generation waren mit P815 immunisiert, getestet und entsprechend ihrer CTL-Aktivität innerhalb der hohen und niedrigen Linie selektiert und gepaart worden. Von den 27 Tieren der hohen Linie erreichten die 19 Männchen CTL-Werte von $15,37 \pm 11,23$, die 8 Weibchen von $18,02 \pm 13,06$. Die 31 Tiere der niedrigen Linie zeigten bei den 15 Männchen CTL-Werte von $7,93 \pm 9,05$, bei den 16 Weibchen von $4,85 \pm 4,95$. Die Darstellung der CTL-Werte der Generation F8 a erfolgt in Abbildung 10.

Abb. 10: CTL-Werte der Generation F8 a (gegen EL4)



Die Berechnung der Signifikanz für den Unterschied zwischen hoher und niedriger Linie in der F8 a ergab bei den männlichen und den weiblichen Tieren einen signifikanten Unterschied und für die Gesamtpopulation einen hochsignifikanten Unterschied. Das wichtigste Ergebnis der F8 a war, daß sich die bisher auf P815-Zellen selektierten Linien auch hinsichtlich ihrer "zytotoxischen Kapazität" gegenüber EL4-Zellen signifikant unterschieden.

In Tabelle 5 sind die Signifikanzwerte der Generation F6 b, F7 a, b und F8 a für die Weibchen, Männchen und die Gesamtpopulation aufgelistet.

Tab. 5: Signifikanztest der Differenz zwischen hoher und niedriger Linie

Generation	♀	♂	♀ + ♂
F6 b	$t_{22} = 1,60$ $P > 0,05$ nicht signif.	$t_{24} = 1,30$ $P > 0,05$ nicht signif.	$t_{48} = 5,67$ $P < 0,001$ hochsignif.
F7 a	$t_{31} = 3,65$ $P < 0,001$ hochsignif.	$t_{31} = 4,68$ $P < 0,001$ hochsignif.	$t_{64} = 6,13$ $P < 0,001$ hochsignif.
F7 b	$t_{19} = 0,10$ $P > 0,05$ nicht signif.	$t_{36} = 3,09$ $P < 0,001$ hochsignif.	$t_{57} = 2,41$ $P < 0,05$ signif.
F8 a	$t_{22} = 3,61$ $P < 0,05$ signif.	$t_{32} = 2,09$ $P < 0,05$ signif.	$t_{58} = 3,91$ $P < 0,001$ hochsignif.

$P \geq 0,05$ nicht signifikant

$P \leq 0,05$ signifikant

$P \leq 0,001$ hochsignifikant

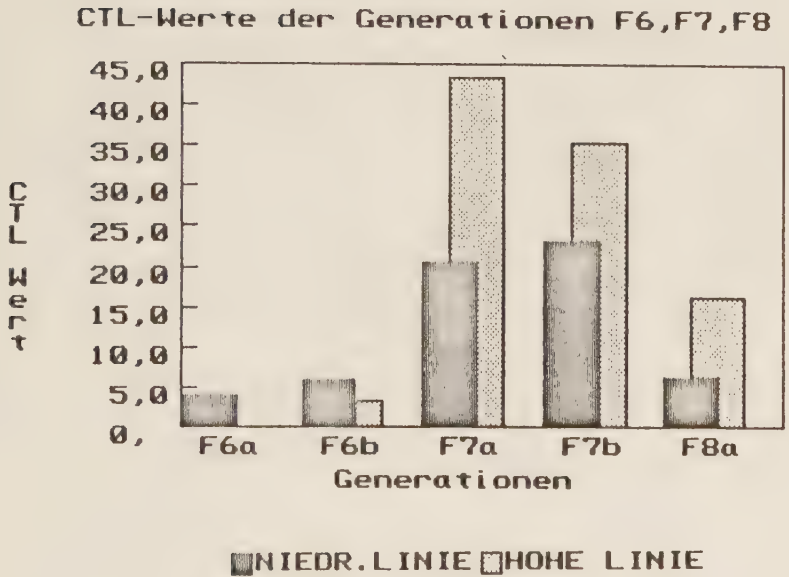
Zur übersichtlichen Darstellung der erhaltenen Resultate in den untersuchten Generationen F6, F7 und F8 sind in Tabelle 6 die Anzahl und die CTL-Werte aller getesteten Mäuse aufgeführt.

Tab. 6: Überblick über Anzahl und CTL-Werte der getesteten Mäuse

Generation	Linie	n	♀	n	♂	n	♀ + ♂
F6 a	hoch	6	0,06 ± 0,13	36	0,36 ± 0,53	9	0,16 ± 0,26
	niedrig	34	3,88 ± 4,78	25	4,44 ± 6,34	59	4,12 ± 5,48
F6 b	hoch	12	2,89 ± 2,27	12	3,59 ± 3,59	24	3,24 ± 2,93
	niedrig	12	5,37 ± 4,84	14	6,25 ± 4,47	26	5,81 ± 4,64
F7 a	hoch	7	36,64 ± 11,78	10	47,81 ± 19,04	17	43,21 ± 16,97
	niedrig	26	19,34 ± 10,94	23	22,17 ± 12,08	49	35,32 ± 11,46
F7 b	hoch	5	20,92 ± 20,40	9	43,32 ± 20,02	14	35,32 ± 22,34
	niedrig	16	20,09 ± 14,34	29	25,05 ± 13,91	45	23,28 ± 14,11
F8 a	hoch	8	18,02 ± 13,06	19	15,37 ± 11,23	27	16,16 ± 11,61
	niedrig	16	4,85 ± 4,95	15	7,93 ± 9,05	31	6,34 ± 7,28
Gesamt n		142		159		301	

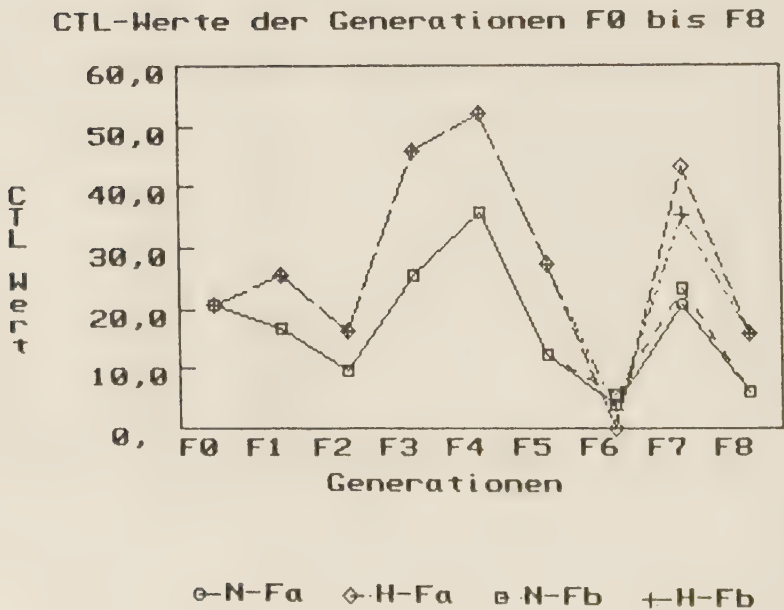
Einen Überblick über die CTL-Werte der Gesamtpopulation der hohen und niedrigen Linie in der F6, F7 und F8 vermittelt die Abbildung 11.

Abb. 11: CTL-Werte der Gesamtpopulation in den Generationen F6, F7, F8



Die Abbildung 12 zeigt den graphischen Verlauf der CTL-Werte der gesamten Population von der F0 bis zur F8.

Abb. 12: Graphische Darstellung des Verlaufs der CTL-Werte in der gesamten Population (F0 bis F8)



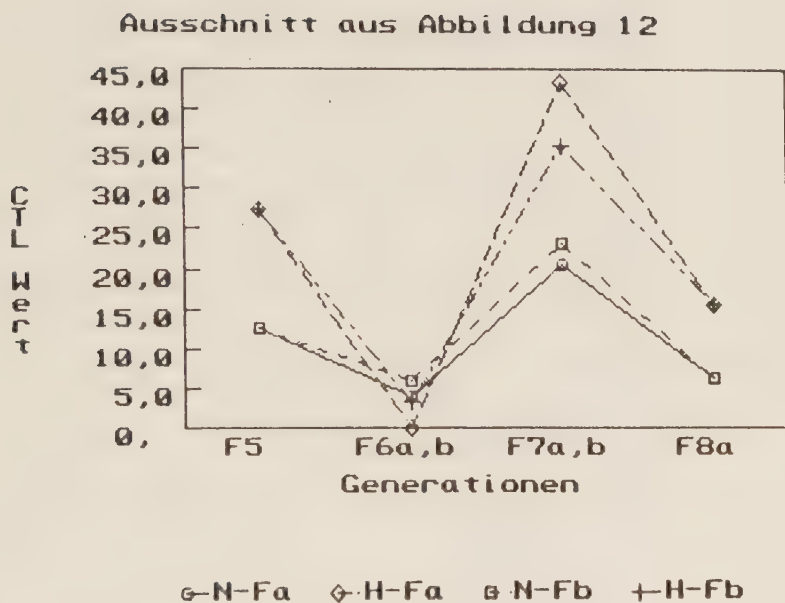
N-Fa: Generation F6 a + F7 a der niedrigen Linie

H-Fa: Generation F6 a + F7 a der hohen Linie

N-Fb: Generation F6 b + F7 b der niedrigen Linie

H-Fb: Generation F6 b + F7 b der hohen Linie

Abb. 13: Ausschnitt aus Abbildung 12



4.5

Ergebnisse des Cold Target Competition Assay

In dieser Testreihe wurde die Spezifität der durch entsprechende Immunisierung, entweder mit P815 oder EL4, erzeugten Effektorzellen überprüft. Hierzu wurden je 5 weibliche NMRI-Mäuse mit P815- bzw. EL4-Zellen immunisiert. In der ersten Platte A wurden markierte P815-Zielzellen zu unmarkierten (kalten) P815-Zellen im Verhältnis 1 : 4, 1 : 2, 1 : 1 und 1 : 0,5 dazugegeben, dieselben Verdünnungsschritte wurden auch in den drei folgenden Platten beibehalten. In der zweiten Platte B wurden markierte P815-Zellen mit unmarkierten EL4 zusammenpipettiert. In der dritten Platte C wurden markierte EL4 mit unmarkierten (kalten) EL4 und in der vierten Platte D markierte EL4 mit unmarkierten P815 verdünnt. In allen 4 Platten wurden Effektorzellen in den Verhältnissen 200 : 1, 100 : 1 und 50 : 1 den Zielzellen dazugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation wurden 100 μ l Überstand abgenommen und im Gammacounter ausgezählt. Die Ergebnisse der Platten A - D in den jeweiligen Effektor : Zielzellen-Verhältnissen (200 : 1, 100 : 1, 50 : 1) sind in den Tabellen 7a, b, c aufgeführt.

Tab. 7a: Ergebnisse des Cold Target Competition Assay

Effektor : Zielzellen-Verhältnis 200 : 1

unmarkierte Zellen	Verhältnis markierte : unmarkierte Zielzellen				
	Kontrolle	1 : 4	1 : 2	1 : 1	1 : 0,5
Platte	⁵¹ Chrom-markierte P815-Zellen				
A P815	15,75	12,25	15,75	16,5	22,25
B EL4	18,53	18,76	17,39	17,85	20,36
	⁵¹ Chrom-markierte EL4-Zellen				
C EL4	16,69	11,07	18,57	18,94	19,51
D P815	18,28	18,09	24,0	20,95	24,38

Tab. 7b: Ergebnisse des Cold Target Competition Assay

Effektor : Zielzellen-Verhältnis 100 : 1

unmarkierte Zellen	Verhältnis markierte : unmarkierte Zielzellen				
	Kontrolle	1 : 4	1 : 2	1 : 1	1 : 0,5
Platte	⁵¹ Chrom-markierte P815-Zellen				
A P815	10,0	7,25	12,25	13,5	17,0
B EL4	14,81	13,95	13,27	14,64	14,18
	⁵¹ Chrom-markierte EL4-Zellen				
C EL4	1,31	0,19	0	0,37	2,44
D P815	1,52	1,52	0,76	4,76	4,19

Tab. 7c: Ergebnisse des Cold Target Competition Assay
Effektor : Zielzellen-Verhältnis 50 : 1

unmarkierte Zellen		Verhältnis markierte : unmarkierte Zielzellen				
		Kontrolle	1 : 4	1 : 2	1 : 1	1 : 0,5
Platte		⁵¹ Chrom-markierte P815-Zellen				
A	P815	13,0	5,0	6,5	9,25	10,75
B	EL4	10,52	11,5	9,84	8,69	10,52
		⁵¹ Chrom-markierte EL4-Zellen				
C	EL4	2,81	0	0,37	2,43	3,94
D	P815	4,76	3,81	3,62	5,14	5,9

Am deutlichsten konnte eine Abnahme der CTL-Aktivität bei Ausverdünnung mit gleichartigen Zellen in Platte A festgestellt werden, hier war in allen drei Verhältnissen der Effektorzellen : Zielzellen ein klarer Abfall des CTL-Wertes zu beobachten. In den unterschiedlichen Verhältnissen von unmarkierten zu markierten Zielzellen ergab die CTR bei der 4 : 1-Verdünnung den niedrigsten Wert und zeigte in den Verdünnungen 2 : 1, 1^a : 1 und 0,5 : 1 einen kontinuierlichen Anstieg. Wurden die markierten P815 in Platte B jedoch mit EL4-Zellen verdünnt, so blieb die CTR in allen 4 Verdünnungsstufen nahezu konstant.

Abb. 14: Cold Target Competition Assay: Platte A
(markierte P815-Zellen + unmarkierte
P815-Zellen)

Cold Target Competition Assay: Platte A

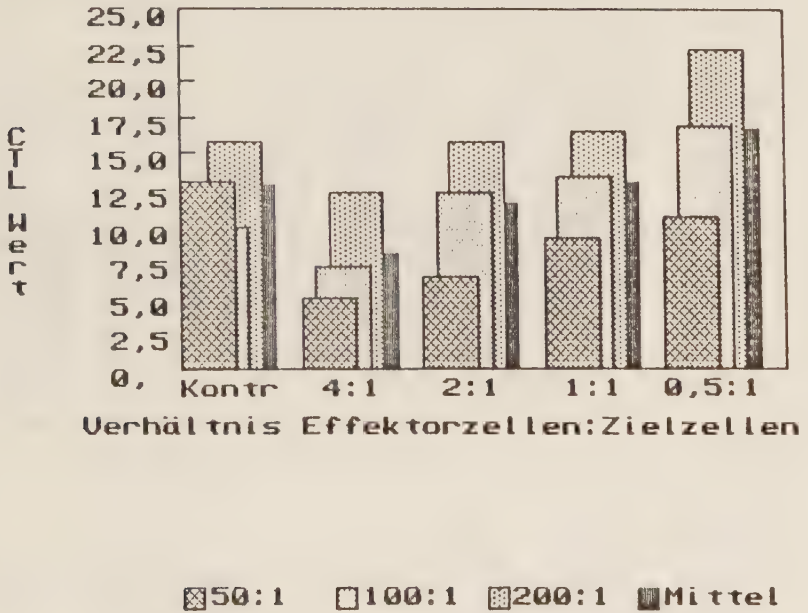
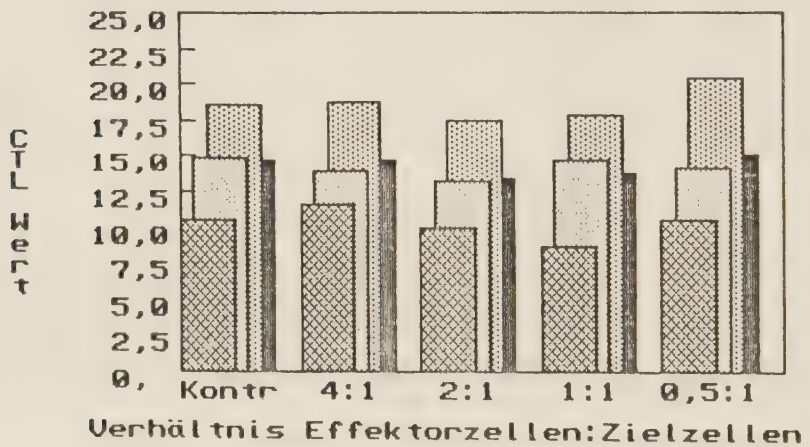


Abb. 15: Cold Target Competition Assay: Platte B
(markierte P815-Zellen + unmarkierte
EL4-Zellen)

Cold Target Competition Assay: Platte B



■ 50:1 □ 100:1 ▨ 200:1 ■ Mittel

Bei der Ausverdünnung der markierten EL4-Zellen in Platte C wurden bei Zugabe von 100 : 1 bzw. 50 : 1 Effektorzellen : Zielzellen nur relativ niedrige CTR-Werte erreicht, und somit ergab sich kein so deutliches Bild wie mit den P815-Zellen. Jedoch konnte auch hier im Effektor-Zielzellen-Verhältnis 200 : 1 ein klarer Anstieg der CTL-Aktivität von der Verdünnungsstufe 4 : 1 (unmarkierte : markierte EL4-Zellen) aus, ansteigend zur Verdünnungsstufe 0,5 : 1, gezeigt werden. In der Platte D konnte analog zur Platte B keine Abnahme des CTL-Wertes bei Zugabe von unmarkierten, verschiedenartigen Zellen festgestellt werden.

Abb. 16: Cold Target Competition Assay: Platte C
(markierte EL4-Zellen + unmarkierte
EL4-Zellen)

Cold Target Competition Assay: Platte C

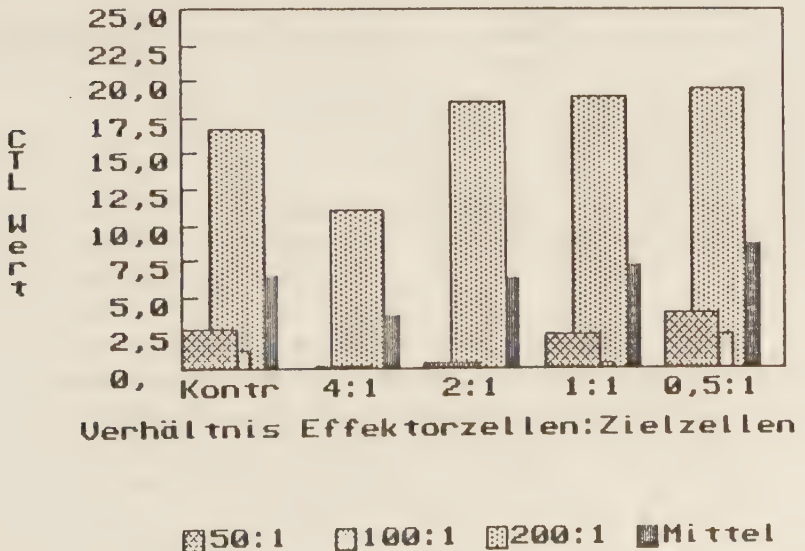
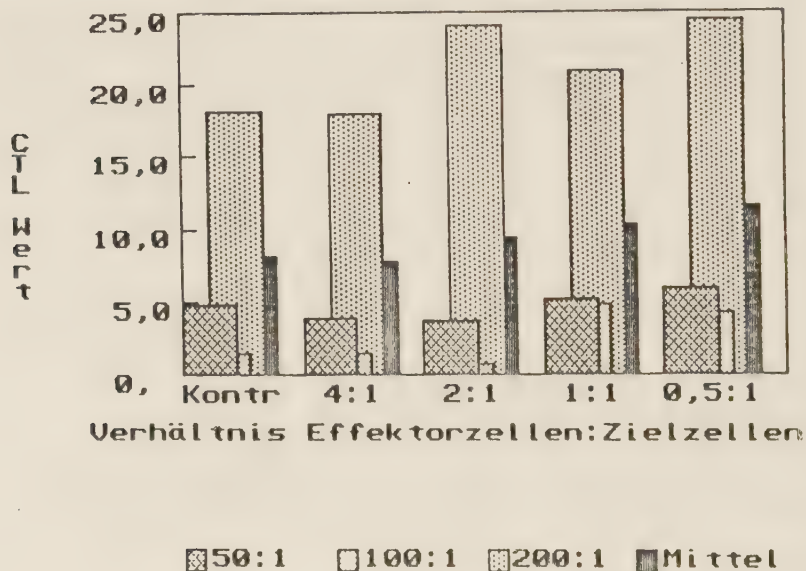


Abb. 17: Cold Target Competition Assay: Platte D
(markierte EL4-Zellen + unmarkierte
P815-Zellen)

Cold Target Competition Assay: Platte D



Wie aus den Grafiken ersichtlich ist, resultiert die Zugabe unmarkierter Zielzellen der gleichen Spezifität wie die der markierten Zielzellen in einer Konkurrenzsituation um die Effektorzellen, die sich in einem Abfall der CTR manifestiert. Dagegen hat die Zugabe von Zielzellen verschiedener Spezifität keinen Einfluß auf die CTL-Aktivi-

tat. Somit kann man auf einfache Weise die Spezifität der Effektorzellen für die jeweils zur Immunisierung verwendete Tumorzelllinie nachweisen.

Aus den obigen Ergebnissen kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß verschiedene Populationen von Effektorzellen für die Zytotoxizität gegen P815- und EL4-Zellen verantwortlich sind.

4.6

Ergebnisse der zellulären Immunadsorption

Zur weiteren Bestimmung der Spezifität der unterschiedlichen Effektorzellen wurden diese für 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank auf einem Monolayer aus EL4-Zellen inkubiert und anschließend die nicht adhärenenten Effektorzellen gegen markierte P815-Zellen einerseits und gegen markierte EL4-Zellen andererseits getestet. In Platte A wurden als Zielzellen markierte P815 verwendet, gegen die zunächst als Kontrolle nicht adsorbierte Effektorzellen getestet wurden. Hierbei ergab sich nur für die Effektorzellen aus mit P815 immunisierten Mäusen eine CTR, für die Effektorzellen aus EL4-immunisierten Mäusen konnte keine CTR nachgewiesen werden. Auch nach der 5stündigen Adsorption auf dem EL4-Monolayer konnte für die P815-Effektorzellen eine unveränderte CTR gemessen werden.

Auf Platte B wurden dieselben schon in Platte A verwendeten Effektorzellen gegen markierte EL4-Zielzellen getestet. Auch hier wurde in der Kontrolle (ohne Adsorptionsschritt) eine CTL-Aktivität nur bei den EL4-Effektorzellen gemessen, die P815-

Effektorzellen ergaben keine CTR gegen die markierten EL4-Zellen. Im Unterschied zu Platte A konnte hierbei aber nach den 5 Stunden Inkubation auf dem EL4-Monolayer keine CTL-Aktivität der EL4-Effektorzellen mehr nachgewiesen werden. Daraus läßt sich auf eine Adsorption der Effektorzellen auf den EL4-Tumorzellmonolayer schließen, die die CTR-aktiven Effektorzellen gegen die EL4-Zielzellen beseitigt hat. Die Ergebnisse der zellulären Immunadsorption bzw. ihre Auswertung sind in Tabelle 8 bzw. 9 aufgelistet.

Tab. 8: Ergebnisse der zellulären Immunadsorption auf dem EL4-Monolayer

Effektorzellen	CTL-Werte (% spezifischer Release) gegen					
	Platte A: P815			Platte B: EL4		
	200:1	100:1	50:1	200:1	100:1	50:1
P815-Effektorzellen, nicht adsorbiert	13,78	7,57	3,69	0	0	0
P815-Effektorzellen adsorbiert	12,62	11,06	5,82	0	0	0
EL4-Effektorzellen nicht adsorbiert	0	0	0	2,43	0,40	0,27
EL4-Effektorzellen adsorbiert	0	0	0	0	0	0

Tab. 9: Auswertung der Ergebnisse der zellulären Immunadsorption auf dem EL4-Monolayer

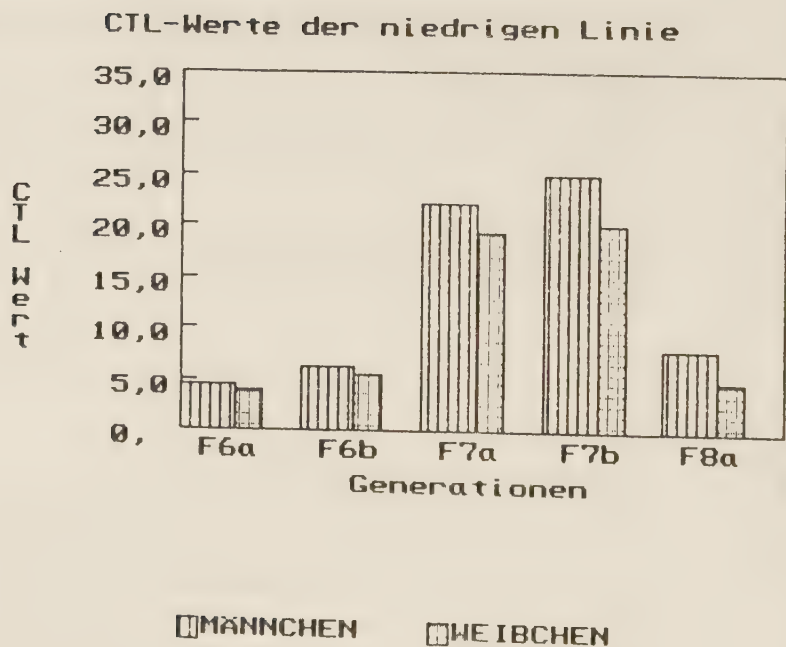
Effektorzellen	Test gegen	
	P815-Zielzellen	EL4-Zielzellen
P815-Effektorzellen, nicht adsorbiert	+	-
P815-Effektorzellen adsorbiert	+	-
EL4-Effektorzellen, nicht adsorbiert	-	+
EL4-Effektorzellen adsorbiert	-	-

Aus Tabelle 8 und 9 geht hervor, daß nur die Effektorzellen bzw. Milzzellen von mit EL4-Zellen immunisierten Mäusen durch einen Adsorptionsschritt auf dem EL4-Monolayer zurückgehalten werden, nicht jedoch die Milzzellen von mit P815-Zellen immunisierten Mäusen, d. h., es besteht keine antigene Kreuzreaktivität zwischen P815- und EL4-Zellen.

4.7 Vergleich der CTL-Antworten zwischen den Geschlechtern

Bei der Berechnung des CTL-Wertes getrennt nach Geschlecht konnte auch in der F6, F7 und F8 eine Differenz zwischen männlichen und weiblichen Tieren beobachtet werden. In allen Generationen hatten die Männchen der niedrigen Line einen höheren CTL-Wert als die Weibchen.

Abb. 18: CTL-Werte der Männchen und Weibchen in der niedrigen Linie



Ausgenommen in der F8 a, bei der die CTL-Antwort der Weibchen über der der Männchen lag, dominierte auch in den übrigen Generationen der hohen Linie die CTL-Antwort der Männchen.

Abb. 19: CTL-Werte der Männchen und Weibchen in der hohen Linie

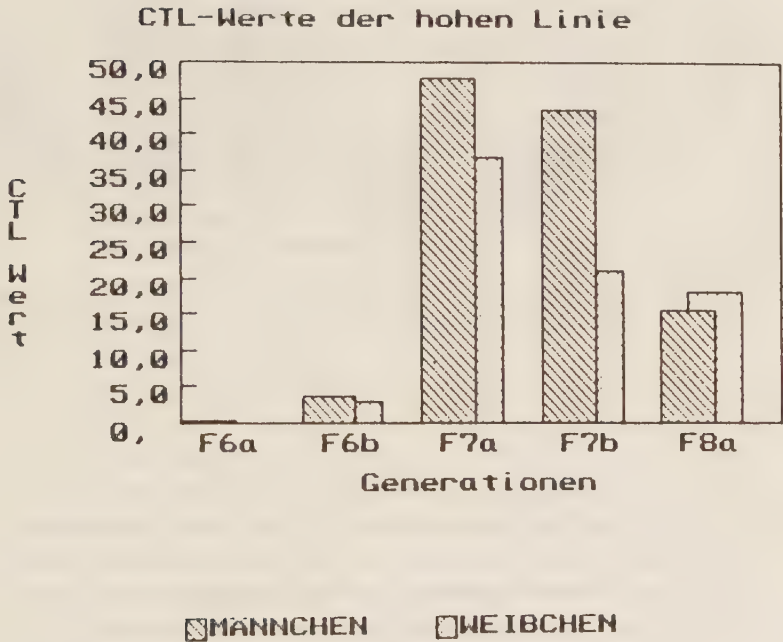
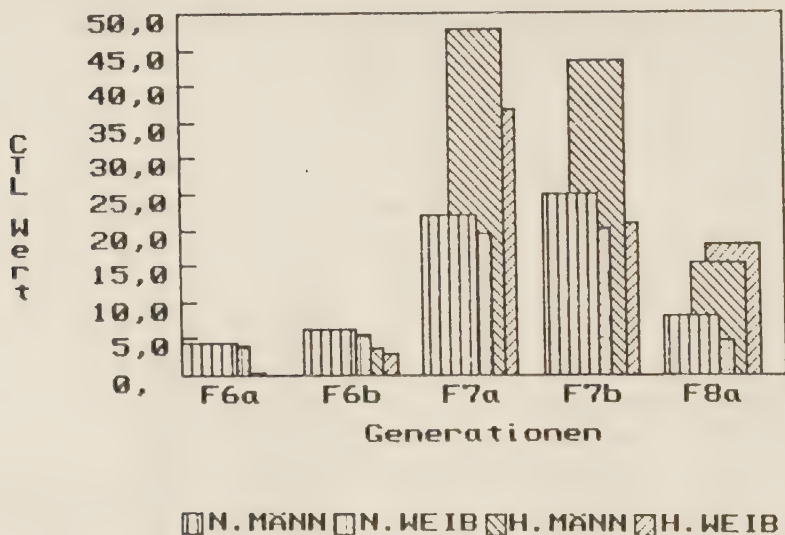


Abb. 20: CTL-Werte der Männchen und Weibchen in der niedrigen und hohen Linie

CTL-Werte der niedrigen und hohen Linie



Verfolgt man die Verteilung der CTL-Antwort zwischen den Geschlechtern durch sämtliche Generationen, so zeigt sich in der niedrigen Linie durch alle Generationen eine Überlegenheit der männlichen Tiere. In der hohen Linie ergab sich nur in der F3 eine deutliche Überlegenheit der CTL-Werte der weiblichen Tiere gegenüber den männlichen, in den Generationen F4 und F8 a lagen die weiblichen Tiere nur geringfügig über dem CTL-Wert der männlichen Tiere, in allen anderen Generationen dominierten auch in dieser Linie die männlichen Tiere.

5.

DISKUSSION

Das vielfaltige und wirkungsvolle Immunsystem der Säugetiere entstand durch natürliche Selektion, es begann mit einer relativ einfachen Organisation bei den Wirbellosen, erfuhr einen ständig zunehmenden Umfang und Wirkungsgrad bei den Wirbeltieren und erreichte seinen Zenit bei den Säugetieren. Hierdurch gelang es dem Immunsystem immer mehr, die Abwehr gegen verschiedene und zunehmend raffinierte Parasiten und Mikroorganismen zu entwickeln und zu verbessern. Mit der Entwicklung des Lymphoid-Systems ging wahrscheinlich die Evolution des MHC einher, der als Abgrenzungsmechanismus die Erhaltung der Integrität und Individualität eines Organismus gewährleisten sollte. Die daraus entstandene polymorphe Regulation der Immunantwort sorgt auf der Grundlage einer heterologen Population für einen möglichst lückenlosen Immunschutz (Klein, 1983).

Die genetische Kontrolle der Immunantwort auf natürliche multideterminante Immunogene wurde in dem hier beschriebenen Selektionsversuch mit Mäusen durch Messung der CTL-Antwort auf P815-, K562- und EL4-Zellen mit anschließender Selektion und Züchtung untersucht. Ausgangsbasis stellten zwei von Schubert 1984 etablierte Mäuselinien dar, die eine hohe bzw. niedrige CTL-Antwort auf P815-Tumorzellen zeigten. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Generationen beinhalten die F6, F7 und F8.

Zur weiteren Charakterisierung der CTL-Antwort wurde in der F6 ein Zellwechsel durchgeführt. Mit dem Wechsel des Antigens sollte das Ausmaß der

zellvermittelten Immunität auch auf andere Immungene untersucht werden. Gleichzeitig sollte damit ein möglicherweise bestehender maternaler Effekt auf die Immunantwort der Nachkommen überprüft werden. Die zunächst vorgesehenen K562-Zellen konnten für den CTL-Test nicht beibehalten werden, da mit ihnen keine Stimulation der zytotoxischen T-Lymphozyten zu erreichen war. Der verbleibende Teil der Generation F6 wurde mit EL4-Zellen erfolgreich immunisiert und getestet. Die nachfolgende Generation F7 wurde einheitlich mit den ursprünglichen P815-Zellen untersucht und in der letzten Generation (F8) wurden nochmals EL4-Zellen verwendet.

Die zur zellvermittelten Immunität zählende CTR unterliegt einer polygenen Steuerung, was bedeutet, daß eine hohe oder niedrige Immunantwort auf ein Antigen einer sehr komplexen Immunregulation unterliegt, die durch viele verschiedene Genloci beeinflusst wird. Dieses erklärt, warum innerhalb der in diesem Selektionsversuch etablierten Linien immer noch hohe individuelle Schwankungen der CTL-Aktivität auftreten, und läßt vermuten, daß ein Selektionslimit noch nicht erreicht wurde. Biozzi benötigte für seine hohe und niedrige Linie zwischen 7 und 16 Generationen und errechnete, daß zwischen 2 und 18 unabhängige Genloci die quantitative Antikörperantwort kontrollieren (Biozzi et al., 1979). Das in dem hier vorgestellten Versuch gewählte Selektionskriterium stellt ein sehr viel komplexeres Immunogen dar, an dem eine größere Anzahl unabhängiger Genloci beteiligt ist. Diese Tatsache würde ein Mehrfaches an Generationen und Selektionen erfordern, bis eine Anhäufung der selektierten Genmerkmale erfolgt. Hierfür sprächen auch unmittelbar die errechneten realisierten Heritabi-

litäten (h^2), die sich, im Gegensatz zu den relativ gleichbleibenden Werten (Mittelwert $h^2 = 0,20$) in Biozzis Versuchen, in dem hier beschriebenen Selektionsversuch in sehr großen Bandbreiten bewegten - zum Teil waren sie rechnerisch nicht ermittelbar oder tatsächlich nicht vorhanden, zum Teil erreichten sie Werte bis zu $h^2 = 0,6$.

Biozzi beschrieb den Effekt seiner selektiven Züchtungen als nicht spezifisch und nicht auf das zur Selektion benutzte Antigen (Schäfererythrozyten) begrenzt. Die Wirkung der Selektion betraf auch Antikörperantworten auf viele nicht mit den Selektionsantigenen verwandte Immunogene. Eine ähnliche Beeinflussung der zellvermittelten Immunantwort durch die erfolgte Selektion könnte man in der hier beschriebenen F8 a vermuten. Trotz Wechsels des Immunogens von P815- auf EL4-Zellen kam es zu keiner wesentlichen Änderung des CTL-Wertes zwischen der hohen und niedrigen Linie, und ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Linien blieb bestehen.

Zur gleichen Zeit wurde mit einem Antigenwechsel ein Einfluß maternaler Effekte auf die Stärke der Immunantwort der Nachkommen überprüft (Hetzer, 1937). Durch den Vergleich der Werte zwischen F5 und F7 kann ein Effekt dieser Art verneint werden. Trotz der in der Generation F6 a erfolgten Immunisierung mit anderen als den vorher verwendeten Zellen und ohne erfolgten Selektionsschritt liegt die F7 a in dem CTL-Wert der hohen Linie deutlich über dem der F5 und weist eine größere Differenz zwischen den CTL-Werten der hohen und niedrigen Linie auf. Auch die CTL-Werte der hohen Linie in der F7 b übertreffen die Werte der F5, die Diffe-

renz zwischen hoher und niedriger Linie ist in diesem Teil der Generation nicht mehr so groß wie in der F5. Eine mögliche Erklärung hierfür läge in dem in der F6 b erfolgten Selektionsschritt, der sich nach den erhaltenen CTL-Werten gegen EL4-Zellen gerichtet hatte.

Der erstmalig mit K562 durchgeführte Zellwechsel konnte in der F6 a keine CTL-Antwort in beiden Linien induzieren. In der Literatur (Lozzio und Lozzio, 1979) wurden K562-Zellen hauptsächlich in athymischen oder immundefizienten Mäusen getestet, offenbar kommt es in immunkompetenten Mäusen zur Elimination (Antikörper, NK-Zellen?) der Tumorzellen. Auch bestünde die Möglichkeit, daß es sich bei den K562-Zellen um MHC-Klasse-1-defiziente Tumorzellen handelt, die von den MHC-Klasse-1-restringierten CTL nicht lysiert werden können.

Während der erstmaligen Verwendung der EL4-Zellen in der Generation F6 b kam es zu einer relativ niedrigen CTL-Antwort sowohl in der hohen ($3,24 \pm 2,93$) als auch in der niedrigen ($5,81 \pm 4,64$) Linie; in dieser Generation zeigte die niedrige Linie sogar den höheren CTL-Wert von beiden. Im Verlauf der erneuten Testreihe mit den EL4-Zellen in der F8 a lag die CTL-Antwort besonders in der hohen Linie über den Ergebnissen der F6 b (hohe Linie $16,16 \pm 11,61$; niedrige Linie $6,34 \pm 7,28$). Eine Erklärung dieser Unterschiede zwischen beiden Generationen könnte in dem Alter der Testtiere liegen, das sich in der F6 b durch die Suche nach einer geeigneteren Zelllinie als K562 auf ein durchschnittliches Testalter von 141 Tagen verschoben hatte, wogegen es in der F8 a durchschnittlich 47 Tage betrug.

In den Untersuchungen über die Spezifität der erzeugten zytotoxischen T-Zellen mit Hilfe des Cold Target Competition Assay ergab sich eine Abnahme des CTL-Wertes nur bei Verdünnung der markierten Zielzellen mit gleichen unmarkierten Zielzellen, nicht jedoch mit unmarkierten verschiedenartigen Zielzellen. In gleicher Weise wurden bei der zellulären Immunadsorption nur die Effektorzellen zurückgehalten, die spezifisch gegen die Zellen des Monolayers reagierten. Aus beiden Untersuchungen ergibt sich eine Spezifität der zytotoxischen T-Lymphozyten gegenüber den Zellen, mit denen vorher immunisiert wurde. Als zusätzliche Kontrolle des ⁵¹Chrom-Freisetzungstests wurden Tiere ohne vorhergehende Immunisierung mit untersucht. Ebenso wurden in der F7 in einem Parallelansatz die Effektorzellen von mit P815-Zellen immunisierten Tieren gegen EL4-Zielzellen getestet. In beiden Kontrolluntersuchungen ergab sich ein CTL-Wert unter 1, was bestätigte, daß die zytotoxischen T-Zellen in der Tat nur gegenüber ihren jeweiligen Zielzellen spezifisch reagierten (Cerottini und Brunner, 1974). Zusammenfassend sprechen folgende Ergebnisse dafür, daß verschiedene Effektor-Zellpopulationen die zytotoxische Reaktion gegen P815- und EL4-Zellen durchführen: 1. Ergebnisse der Generation F6, 2. Ergebnisse der Generation F7 a, 3. Ergebnisse des Cold Target Competition Assay, 4. Ergebnisse der zellulären Immunadsorption.

Bei der Betrachtung verschiedener Parameter der Immunantwort zwischen männlichen und weiblichen Tieren einer selektierten Population wurde durch Buschmann und Meyer (1981) eine höhere Phagozytoseaktivität der Weibchen festgestellt. In ihren Untersuchungen über die Antikörperantwort

von low und high respondern fanden Biozzi et al. (1979) eine höhere Antikörperantwort der weiblichen Tiere. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die CTL-Werte getrennt nach Geschlechtern ausgerechnet und mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Generationen verglichen. Im Unterschied zu den oben aufgezählten Befunden stellte sich eine Überlegenheit der männlichen Tiere heraus, die sich in der niedrigen Linie durch alle Generationen von der F0 bis zur F8 zog. In der hohen Linie zeigten die weiblichen Tiere nur in der F3 einen deutlich höheren CTL-Wert, in den Generationen F4 und F8 war dieser minimal über dem CTL-Wert der Männchen, und in allen übrigen Generationen wurden sie von den männlichen Tieren übertroffen.

Biozzi stellte in seinen Selektionsversuchen u. a. eine umgekehrte Beziehung zwischen Antikörperantwort und Makrophagenaktivität fest, letztere war größer in der niedrigen Linie. In Untersuchungen über die Abwehr intrazellulärer Parasiten (z. B. gramnegative Bakterien) stellte sich eine höhere natürliche Resistenz der niedrigen Linie, verbunden mit einer größeren Abwehr und Überlebenschance, heraus (Biozzi et al., 1984). Es zeigte sich, daß die Selektion auf ein bestimmtes Merkmal der Immunantwort neben Vorteilen auch zu negativen Auswirkungen führen kann. Im Zusammenhang mit dem hier vorgestellten Selektionsversuch wäre eine Überprüfung der Antikörperantwort und Makrophagenaktivität auf beliebige Immunogene und ihre möglicherweise erfolgte Beeinflussung durch die Selektion ein interessanter Untersuchungsparameter.

Die anfangs schon angedeutete große Anzahl beteiligter Genloci würde eine entsprechende Anzahl von Generationen bis zum Erreichen eines etwaigen Selektionsplateaus erfordern. Dem gegenüber steht die Tatsache der ansteigenden Inzucht und der damit einhergehenden Uniformität der Population. Schon lange ist bekannt, daß mit zunehmender Inzucht der Fitness-Index (z. B. Fruchtbarkeit, Nachkommenzahl, Lebensfähigkeit der Jungen etc.) einer Population abnimmt (Barnett und Coleman, 1960). In dem hier vorgestellten Selektionsversuch wurde dieses Phänomen zunehmend deutlich in der hohen Linie, in der in ansteigendem Maße sowohl Fruchtbarkeit, Wurfgröße als auch Überlebensrate der geborenen Jungen im Vergleich zur niedrigen Linie abnahmen, was letztendlich dazu führte, daß in der selektierten und gepaarten Generation F8 b keine Nachkommen der hohen Linie mehr gezüchtet werden konnten.

Vergleichbar mit dem Polymorphismus des MHC als Folge negativer Selektion durch Antigene könnte die Heterozygotie einer Population das Ergebnis einer natürlichen Selektion sein (Jinks und Mather, 1955), die innerhalb einer Population die beste Garantie für ihr Überleben darstellt. Daher sollte man bei Züchtungen auf bestimmte Selektionsmerkmale nicht nur den angestrebten Parameter, sondern auch andere gleichzeitig beeinflusste Kriterien im Auge haben (Buschmann und Meyer, 1981). In besonderem Maße gilt diese Forderung für die wirtschaftliche, aber auch hobbymäßige Haustierzüchtung, bei der an oberster Stelle allgemeine Parameter der Gesundheit und Fitness stehen sollten.

6.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Verhalten von einzelnen Parametern der zellulären Immunität wurde in der vorliegenden Arbeit im Selektionsexperiment mit Mäusen untersucht. Als Selektionsmerkmal wurde die zytotoxische Aktivität von T-Lymphozyten gegenüber P815-Tumorzellen gewählt, die im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest gemessen wurde. In dem sich mittlerweile in den Generationen F6, F7 und F8 befindlichen Selektionsversuch gelang die Etablierung von zwei Linien mit hoher bzw. niedriger Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten bereits in der F1. Der Unterschied zwischen beiden Linien war bis zur F5 signifikant bis hochsignifikant.

In der F6 wurde erstmals ein Zellwechsel durchgeführt, ein Teil der F6 wurde ohne Erfolg mit K562-Zellen immunisiert, aus diesem Grund wurde der andere Teil mit EL4-Zellen getestet. Verglichen mit den Ergebnissen in früheren Generationen, lagen die CTL-Werte in beiden Linien der F6 sehr niedrig, die niedrige Linie war in ihrem CTL-Wert geringfügig über dem der hohen Linie.

In der F7 wurde erneut die ursprüngliche Zelllinie P815 verwendet. Die CTL-Antworten erreichten Werte vorangegangener Generationen und der Unterschied beider Linien war wieder signifikant bis hochsignifikant. Durch den in der vorangegangenen Generation F6 erfolgten Zellwechsel und die hierdurch unbeeinflussten CTL-Werte in der F7 kann man davon ausgehen, daß ein Einfluß maternaler Effekte auf die Stärke der Immunantwort bei den Nachkommen nicht bestand.

In der F8 a wurde nochmals mit EL4 getestet, diesmal blieb trotz des Zellwechsels eine große Differenz im CTL-Wert zwischen der hohen und niedrigen Linie bestehen. Mögliche Gründe für die unterschiedlichen CTL-Werte gegen EL4-Zellen in der F6 b und in der F8 a könnten im Testalter der Mäuse zu suchen sein.

Zur Untersuchung der Spezifität der erzeugten Effektorzellen wurden der Cold Target Competition Assay und die zelluläre Immunadsorption durchgeführt. Die Ergebnisse beider Tests bestätigten, daß die erzeugten Effektorzellen jeweils spezifisch gegen die zur Immunisierung verwendeten Tumorzellen reagierten.

7.

SUMMARY

A selection experiment on cytotoxic activity of T-lymphocytes to P815 mastocytoma cells in mice.

The study of several characters in cell-mediated immune response was undertaken by selective breeding of mice. As the most important character the cytotoxic activity of T-lymphocytes to P815 tumor cells was chosen, which was measured in the chromium 51 (^{51}Cr) release assay. The selective breeding, meanwhile in the generation F6, F7 and F8, succeeded in establishing two lines of high and low cytotoxic T-lymphocyte activity already in the F1. Until the F5 the interline difference had been significant to highly significant.

At first in the F6 a change of tumor cells was performed, one half of the F6 was immunized ineffectively with K562 cells, therefore these cells were changed and the other half tested with EL4 cells. Compared with the CTL response of former generations they reached rather small values in both lines, the low responder showed slightly higher CTL results than the high responder. In the F7 the former change of tumor cells in the F6 did not result in any variation in the CTL answer, compared to the past generations. This showed, that an influence of maternal effects on the strength of the immune response in the progeny was not existent.

Again the F7 was tested with the originally used P815 tumor cells. The CTL answers returned to results of former generations and the interline difference raised back to significant up to high significant.

The F8 generation once again was tested with EL4 cells and although the change of cells this time the difference in the CTL answer between the high and low responder continued. Possible reasons for the distinct CTL response against EL4 in the F6 b and in the F8 a could consist in the test age of the mice.

To investigate the specificity of the induced effector cells the cold target competition assay and the cellular immunoadsorption were performed. In both tests the results showed, that the produced effector cells reacted specifically against the tumor cells, which had been used for immunization.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Allison, J. P., McIntyre, B. W., Bloch, D.: Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. *J. Immunol.* 129, 2293, (1982)
- Babitt, B. P., Allen, P. M., Matusueda, G., Haber, E., Unanue, E. R.: Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317, 359, (1985)
- Bach, F. H., Bach, M. I., Soudel, P. M.: Differential function of the major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature* 259, 273, (1976)
- Barnett, S. A., Coleman, E. M.: Heterosis in F_1 mice in a cold environment. *Genet. Res.* 1, 25, (1960)
- Benacerraf, B., Unanue, E. R.: Textbook of Immunology. Williams & Wilkins, Baltimore/London, (1979)
- Bevan, M. J.: The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T-cells directed against minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.* 142, 1349, (1975)
- Biozzi, G., Mouton, D., Sant'Anna, O. A., Passos, H. C., Genanari, M., Reis, M. H., Ferreira, V. C. A., Heumann, A. M., Bouthillier, Y., Ibanez, O. M., Stiffel, C., Siqueira, M.: Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 85, 31, (1979)

- Biozzi, G., Mouton, D., Stiffel, C., Bouthillier, Y.: A major role of the macrophage in quantitative genetic regulation of immunoresponsiveness and anti-infectious immunity. *Adv. Immunol.* 36, 189, (1984)
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Benett, W. S., Strominger, J. L., Wiley, D.C.: Structure of the human class 1 histocompatibility antigen, HLA - A2. *Nature* 329, 506, (1987 a)
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B. Benett, W. S., Strominger, J. L., Wiley, D. C.: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class 1 histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512, (1987 b)
- Blanden, R. V., Ada, G. L.: A dual recognition model for cytotoxic T-cells based on thymic selection of precursors with low affinity for self H-2 antigens. *Scand. J. Immunol.* 7, 181, (1978)
- Borst, J., Alexander, S., Elder, J., Terhorst, C.: The T 3 complex on human T-lymphocytes involves four structurally distinct glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 258, 5135, (1983)
- Brenner, M. B., McLean, J., Dialynas, D. P., Strominger, J. L., Smith, J. A., Owen, F. L., Seidman, J. G., Ip, S., Rosen, F., Krangel, M. S.: Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322, 145, (1986)
- Brunner, K. T., Mauel, J., Cerottini, J. C., Chapuis, B.: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogenic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14, 181, (1968)

Burnet, F. M.: In: The clonal selection theory of acquired immunity. University Press, Oxford, (1959)

Buschmann, H. G., Meyer, J.: Resistenzzucht bei der Maus. Etablierung von zwei Mäuselinien, welche auf hohes und niedriges Phagozytosevermögen selektiert worden sind. Zbl. Vet. Med. B 28, 713, (1981)

Cantor, H., Boyse, E. A.: Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses in a differentiative process independent of antigen. J. Exp. Med. 141, 1376, (1975 a)

Cantor, H., Boyse, E. A.: Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly^+ cells in the generation of killer activity. J. Exp. Med. 141, 1390, (1975 b)

Cantor, H., Gershon, R. K.: Immunological circuits: cellular composition. Fed. Proc. 38, 2058, (1979)

Cerottini, J. C., Brunner, K. T.: Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection, and tumor immunity. Adv. Immunol. 18, 67, (1974)

Chien, Y. H., Becker, D. M., Lindsten, T., Okamura, M., Cohen, D. J., Davis, M. M.: A third type of murine T-cell receptor gene. Nature 312, 31, (1984)

Claman, H. N., Chaperon, E. A., Triplett, R. F.: Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 1167, (1966)

- Counce, S., Smith, P., Barth, R., Snell, G. D.: Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *Ann. Surg.* 144, 198, (1956)
- Cresswell, P., Turner, M. J., Strominger, J. L.: Painless-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1603, (1973)
- Dembic, Z., Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Kiefer, H., von Boehmer, H., Steinmetz, M.: Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. *Nature* 320, 232, (1986)
- Dunn, T. B., Potter, M.: A transplantable mast-cell neoplasm in the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 18, 587, (1957)
- Erb, P., Feldmann, M.: The role of macrophages in the generation of T-helper-cells. II. The genetic control of the macrophage T-cell-interaction for helper cell induction with soluble antigens. *J. Exp. Med.* 142, 460, (1975)
- Feldmann, M., Rosenthal, A., Erb, P.: Macrophage-lymphocyte interactions in immune induction. *Int. Rev. Cytol.* 60, 149, (1979)
- Germain, R. N.: The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 322, 687, (1986)
- Gershon, R. K.: T-cell control of antibody production. *Contemp. Top. Immunobiol.* 3, 1, (1974)

- Gorczynski, R. M., Miller, R. G., Phillips, R. A.: In vivo requirement for a radiation-resistant cell in the immune response to sheep erythrocytes. *J. Exp. Med.* 134, 1201, (1971)
- Gordon, R. D., Simpson, E., Samelson, L. E.: In vitro cell-mediated immune responses to the male specific (H-Y) antigen in mice. *J. Exp. Med.* 142, 1108, (1975)
- Gorer, P. A.: The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. *J. Pathol. Bacteriol.* 44, 691, (1937)
- Gorer, P. A.: Studies in antibody response of mice to tumor inoculation. *Brit. J. Cancer* 4, 372, (1950)
- Goverman, J., Hunkapiller, T., Hood, L.: A speculative view of the multicomponent nature of T cell antigen recognition. *Cell* 45, 475, (1986)
- Grey, H., Kubo, R., Colon, S., Poulik, M., Cresswell, P., Springer, T., Turner, M., Strominger, J.: The small subunit of HL-A Antigens is β_2 -Microglobulin. *J. Exp. Med.* 138, 1608, (1973)
- Haskins, K., Kubo, R., White, J., Pigeon, M., Kappler, J., Marrack, P.: The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor in T-cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 157, 1149, (1983)
- Hauptfeld, V., Hauptfeld, M., Klein, J.: Tissue distribution of I-region-associated antigens in the mouse. *J. Immunol.* 113, 181, (1974)

- Hebermann, R. B., Nunn, M. E., Lavrin, D. H.: Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* 16, 216, (1975)
- Heberman, R. B., Ortaldo, J. R.: Natural Killer cells: their role in defenses against disease. *Science* 214, 24, (1981)
- Hedrick, S. M., Cohen, D., Nielsen, E., Davis, M.: Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane associated proteins. *Nature* 308, 149, (1984)
- Hetzer, H. D.: The genetic basis for resistance and susceptibility to *Salmonella aertrycke* in mice. *Genetics*, 22, 264, (1937)
- Hood, L., Kronenberg, M., Hunkapiller, T.: T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* 40, 225, (1985)
- Hunkapiller, T., Hood, L.: The growing immunoglobulin gene superfamily. *Nature* 323, 15, (1986)
- Ischii, N., Nagy, Z. A., Klein, J.: Restriction molecules involved in the interaction of T cells with allogeneic antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 156, 622, (1982)
- Jinks, J. L. Mather, K.: Stability in development of heterozygotes and homozygotes. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 143, 561, (1955)

- Katz, D. H., Graves, M., Dorf, M. E., Dimuzio, H., Benacerraf, B.: Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. VII. Cooperative responses between lymphocytes are controlled by genes in the I-Region of the H2-complex. J. Exp. Med. 141, 263, (1975)
- Kaufman, J. F., Auffray, C., Korman, A. J., Shackelford, D. A., Strominger J.: The class 2 molecules of the human and murine major histocompatibility complex. Cell 36, 1, (1984)
- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur. J. Immunol. 5, 112, (1975)
- Klein, J.: Biology of the mouse histocompatibility-2 complex. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1975)
- Klein, J.: The major histocompatibility complex of the mouse. Science 203, 516, (1979)
- Klein, J., Figueroa, F.: Polymorphism of the mouse H-2 loci. Immunol. Rev. 60, 23, (1981)
- Klein, J., Rammensee, H. G., Nagy, Z. A.: Der Haupt-histokompatibilitätskomplex und die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd durch das Immunsystem. Naturwissenschaften 6, 265, (1983)
- Kronenberg, M., Siu, G., Hood, L., Shastri, N.: The molecular genetics of the T cell antigen receptor and T cell antigen recognition. Ann. Rev. Immunol. 4, 529, (1986)

- de Landazuri, O. M., Hebermann, R. B.: Specificity of cellular immune reactivity to virus-induced tumors. *Nature (New Biology)* 238, 18, (1972)
- Lilly, F., Boyse, E. A., Old, L. J.: Genetic basis of susceptibility to viral leukaemogenesis. *Lancet* 2, 1207, (1964)
- Lozzio, B. B., Lozzio, C. B.: Properties and usefulness of the original K562 human myelogenous leukemia cell line. *Leukemia Res.* 3, 363, (1979)
- Marrack, P., Endres, R., Shimonkevitz, R., Zlotnick, A., Dialynas, D., Fitch, F., Kappler, J.: The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T-cells. II. Role of the L3T4 product. *J. Exp. Med.* 158, 1077, (1983)
- Marrack, P., Kappler, J.: The antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptor on T-cells. *Adv. Immunol.* 38, 1, (1986)
- McDevitt, H. O., Delovitch, T. L., Press, I. L., Murphy, D.: Genetic and functional analysis of the Ia antigens: their possible role in regulating the immune response. *Transpl. Rev.* 30, 197, (1976)
- McDevitt, H. O., Sela, M.: Genetic control of the antibody response. I. Demonstration of determinant-specific differences in response to synthetic polypeptide antigens in two strains of inbred mice. *J. Exp. Med.* 122, 517, (1965)

McDevitt, H. O., Sela, M.: Genetic control of the antibody response. II. Further analysis of the specificity of determinant-specific control, and genetic analysis of the response to (H,G)A-L in CBA and C57 mice. *J. Exp. Med.* 126, 969, (1967)

McDevitt, H. O., Tyan, M. L.: Genetic control of the antibody response in inbred mice. Transfer of response by spleen cells and linkage to the major histocompatibility (H-2) locus. *J. Exp. Med.* 128, 1, (1968)

Melchers, F., Andersson, J.: B cell activation: three steps and their variations. *Cell* 37, 715, (1984)

Meuer, S. C., Acuto, O., Hussey, R. E., Hodgdon, J. C., Fitzgerald, K. A., Schlossman, S. F., Reinherz, E. L.: Evidence for the T 3-associated 90 K heterodimer as the T-cell antigen receptor. *Nature* 303, 808, (1983)

Miller, J. F. A. P.: Immunological memory. *Contemp. Top. Immunobiol.* 2, 151, (1973)

Miller, J. F. A. P., Mitchell, G. F.: Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128, 801, (1968)

Mitchison, N. A.: Passive transfer of transplantation immunity. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 142, 72, (1954)

Mosier, D. E.: A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science* 158, 1575, (1967)

- O'Brian, S. J., Roelke, M. E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C. A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J. F., Bush, M. Wildt, D. E.: Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227, 1428, (1985)
- Pernis, B., Axel, R.: A one and a half receptor model for MHC-restricted antigen recognition by T-lymphocytes. *Cell* 41, 13, (1985)
- Pernis, B., Forni, L., Luzzati, A. L.: Synthesis of multiple immunoglobulin classes by single lymphocytes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, 175, (1976)
- Reif, A. E., Allen, J. M. V.: The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J. Exp. Med.* 120, 413, (1964)
- Roder, J. C., Haliotis, T.: Do NK cells play a role in antitumor surveillance? *Immunol. Today* 1, 96, (1980)
- Rolle, M., Mayr, A.: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre/neubearb. von Bachmann, P. A., Gedek, B., Mahnel, H., Mayr, A., Schels, H., F. Enke Verlag, Stuttgart, (1984)*
- Ryder, L. P., Svejgaard, A., Dausset, J.: Genetics of HLA disease association. *Ann. Rev. Genet.* 15, 169, (1981)
- Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H. N., Tonegawa, S.: Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309, 757, (1984 a)

- Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H. N., Tonegawa, S.: A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 312, 36, (1984 b)
- Scheibel, I. F.: Hereditary differences in the capacity of guinea-pigs for the production of diphtheria antitoxin. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 20, 464, (1943)
- Schreffler, D. G., David, C. S.: The H2-major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic, variation, function and organization. *Adv. Immunol.* 20, 125, (1975)
- Schubert, M.: Ein Selektionsversuch mit Mäusen auf Aktivität cytotoxischer T-Lymphozyten gegenüber P-815 Mastocytomzellen. Inaug. Diss. Vet. Med. LMU München, (1986)
- Schwartz, R. H.: Immune response (Ir) genes of the murine major histocompatibility complex. *Adv. Immunol.* 38, 31, (1986)
- Shearer, G. M., Rehn, T. B., Garbarino, C. A.: Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 4, 527, (1974)
- Snell, G. D.: Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genetics* 49, 87, (1948)
- Stulting, R. D., Berke, G.: Nature of lymphocyte-tumor in teraction. A general method for cellular immunoadsorption. *J. Exp. Med.* 137, 932, (1973)

Taniguchi, M., Saito, T., Tada, T.: Antigen-specific suppressive factor produced by a transplantable IJ-bearing T-cell hybridoma. *Nature* 278, 555, (1979)

Townsend, A. R. M., Gotch, F. M., Davey, Y.: Cytotoxic T cells recognize fragments of influenza nucleoprotein. *Cell* 42, 457, (1985)

Townsend, A. R. M., Rothbard, J., Gotch, F., Bahadur, G., Wraith, D., McMichael, A.: The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44, 959, (1986)

Vadas, M. A., Miller, J. F. A. P., McKenzie, J. F. C., Chism, S. E., Shen, F. W., Boyse, E. A., Gamble, J. R., Whitelaw, A. M.: Ly and Ia antigen phenotypes of T-cells involved in delayed-type hypersensitivity and in suppression. *J. Exp. Med.* 144, 10, (1976)

Van der Loo, W., Gronowicz, E. S., Strober, S., Herzenberg, L. A.: Cell differentiation in the presence of Cytochalasin B: studies on the "switch" to IgG secretion after polyclonal B cell activation. *J. Immunol.* 122, 1203, (1979)

Wallich, R., Bulbuc, N., Hämmerling, G. J., Katzav, S., Segal, S., Feldmann, M.: Abrogation of metastatic properties of tumor cells by de novo expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. *Nature* 315, 301, (1985)

- Weiss, E. H., Mellor, A., Golden, L., Fahrner, K., Simpson, E., Hurst, J., Flavell, R. A.: The structure of a mutant H-2 gene suggests that the generation of polymorphism in H-2 genes may occur by gene conversion-like events. *Nature* 301, 671, (1983)
- Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L., McCulloch, E. A.: A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony forming cells. *J. Cell. Physiol.* 69, 177, (1967)
- Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L., McCulloch, E. A.: Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 127, 455, (1968)
- Yagüe, J., White, J. Coleclough, C., Kappler, J., Palmer, E., Marrack, P.: The cell receptor: the α and β chains define idotype, and antigen and MHC specificity. *Cell* 42, 81, (1985)
- Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S. P., Aleksander, I., Mak, T.: A human T cell specific cDNA clone that encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308, 145, (1984)
- Zimmermann, M.: Ein Selektionsversuch mit Mäusen auf Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten gegenüber P-815 Mastocytozellen. Inaug. Diss. Vet. Med. LMU München, (1986)
- Zinkernagel, R. M.: Associations between major histocompatibility antigens and susceptibility to disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 33, 201, (1979)

Zinkernagel, R. M., Doherty, P. C.: Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomenengitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701, (1974 a)

Zinkernagel, R. M., Doherty, P. C.: Immunological surveillance against altered self components by sensitized T-lymphocytes in lymphocytic choriomenengitis. *Nature* 251, 547, (1974 b)

An dieser Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr sehr herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der LMU München.

Herrn Prof. Dr. H.G. Buschmann möchte ich für die Überlassung des Themas und für die großzügig gewährte Unterstützung meinen großen Dank aussprechen.

Für die freundliche Überlassung der EL4 Tumorzellen und den jederzeit zur Verfügung stehenden fachkundigen Rat bedanke ich mich herzlichst bei Dr. W. Kuon vom Institut für Immunologie, Goethestraße 31, München.

Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn und Herrn J. Stanglmeier danke ich für die technische Beratung bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials.

Allen Angehörigen des Institutes, insbesondere der Mitarbeiterin unserer Abteilung, Frau R. Schmidt, der Verantwortlichen für die Nährbodenküche, Frau V. Wagner und dem Labor M. Büttner sei für ihre Hilfe und Unterstützung sehr gedankt.

Herzlicher Dank gebührt schließlich Frau U. Meierhofer, die mit großem Fleiß und unermüdlicher Geduld die schriftliche Ausführung meiner Doktorarbeit übernahm.

Oktober 1987

Lebenslauf

Name: Sybille Schrader

Geboren am: 1. Juli 1960 in Darmstadt

Eltern: Gert Schrader, Diplom-Ingenieur
Ria Schrader, geb. Wächtershäuser

Familienstand: ledig

Schulausbildung: von 1966 - 1970 Waldenserschule
Walldorf / Hessen
von 1970 - 1975 Olympia - Morata - Gymnasium
Schweinfurt
von 1975 - 1980 Prälat - Diehl - Gymnasium
Groß - Gerau

Reifeprüfung: Mai 1980

Ausbildung: November 1980 Studienbeginn an der Ludwig-
Maximilians - Universität
München (LMU), Fakultät für
Tiermedizin
August 1986 3. Staatsexamen
September 1986 Übernahme der Doktorarbeit
im Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin der LMU

Verwendete Abkürzungen und Begriffe:

allogen	-	genetisch nicht identische Mitglieder einer Spezies
APC	-	Antigen Presenting Cell
AS	-	Aminosäuren
CTL	-	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTR	-	Zytotoxische T-Lymphozytenreaktion
g	-	Gravitation, Zeichen für Erd- bzw. Fallbeschleunigung
ip	-	intraperitoneal
MHC	-	Major Histocompatibility Complex
MR	-	Maximal Release - maximale radioaktive Freisetzung
NK	-	Natural Killer Cell
sc	-	subkutan
SR	-	Spontan Release - spontane radioaktive Freisetzung
Syngen	-	genetisch identisch in bezug auf alle Transplantationsloci (z. B. eineiige Zwillinge)
TH	-	T-Helferzellen
xenogen	-	genetisch verschiedene Mitglieder zweier unterschiedlicher Spezies

